

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Professor Dr. K. Trautwein)

Die Wirkung von Bakteriophagen auf die Serotypen von *S.gallinarum* (pullorum)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von

Elisabeth Metzger

Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 1957

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Professor Dr. K. Trautwein)

Die Wirkung von Bakteriophagen auf die Serotypen von *S.gallinarum* (pullorum)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Elisabeth Metzger
Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 1957

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Professor Dr. R. Wetzel

Berichterstatter: Professor Dr. K. T r a u t w e i n

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1957.

1. Einleitung

2. Hauptteil

3. Schluss

A. Einleitung des Hauptteils

B. Einleitung des Hauptteils

C. Einleitung des Hauptteils

D. Einleitung des Hauptteils

E. Einleitung des Hauptteils

F. Einleitung des Hauptteils

G. Einleitung des Hauptteils

H. Einleitung des Hauptteils

I. Einleitung des Hauptteils

Meinen lieben Eltern !

J. Einleitung des Hauptteils

K. Einleitung des Hauptteils

L. Einleitung des Hauptteils

M. Einleitung des Hauptteils

N. Einleitung des Hauptteils

O. Einleitung des Hauptteils

P. Einleitung des Hauptteils

Q. Einleitung des Hauptteils

R. Einleitung des Hauptteils

S. Einleitung des Hauptteils

T. Einleitung des Hauptteils

U. Einleitung des Hauptteils

V. Einleitung des Hauptteils

W. Einleitung des Hauptteils

X. Einleitung des Hauptteils

Y. Einleitung des Hauptteils

Z. Einleitung des Hauptteils

aa. Einleitung des Hauptteils

Inhaltsverzeichnis .

I. <u>Einleitung.</u>	Seite	1
II. <u>Literatur.</u>	"	3
A. Morphologie der Bakteriophagen.	"	3
B. Chemische Struktur der Bakteriophagen.	"	3
C. Verhalten von Bakteriophagen gegenüber chemisch-physikalischen Einflüssen.	"	3
D. Entwicklungszyklus der Bakteriophagen.	"	15
1. Adsorption zwischen Bakteriophagen und Bakterien.	"	16
2. Vermehrung von Bakteriophagen in Bakterien.	"	18
3. Mutationen von Phagen.	"	19
4. Interferenz der Phagen.	"	19
5. Lysogenese.	"	20
E. Bakteriophagen in der bakteriologischen Diagnostik.	"	20
III. <u>Eigene Versuche.</u>	"	33
a) Untersuchungsmaterial und -methoden.	"	33
A. Die Kultur.	"	33
B. Unterhalt der S.gallinarum-Kulturen.	"	35
C. Nährböden für die Phagbestimmung.	"	36
D. Vorkommen von Bakteriophagen.	"	37
E. Gewinnung von Phagen.	"	38
F. Phagbestimmung.	"	38
a) Bouillontestverfahren	"	39
b) Plattentestverfahren	"	39
G. Phagwirkung.	"	39
H. Phagvermehrung.	"	40
a) Vermehrung der Phagen in Bouillon	"	40
b) Zirkelvermehrung der Phagen	"	41
b) Problem und Ziel meiner Untersuchungen.	"	42

c) Verlauf der Versuche.	Seite	44
A. Isolierung von Gallinarumbakteriophagen.	"	44
B. Prüfung der isolierten Gallinarumphagen.	"	45
1. Prüfung von Gallinarumphagen gegenüber Salmonella gallinarum-Stämmen.	"	45
2. Prüfung von Gallinarumphagen gegenüber anderen Bakterienarten (Kreuztest).	"	54
C. Anreicherung der S. gallinarum-Phagen und Bestimmung ihrer kritischen Konzentration.	"	56
D. Eigenschaften von Gallinarumphagen gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen.	"	60
1. Methylenblauresistenz der S. gallinarum- Phagen.	"	60
2. pH-Resistenz der Gallinarumphagen.	"	66
3. Formalinempfindlichkeit der Gallinarum- phagen.	"	68
4. Zitratempfindlichkeit der Gallinarum- phagen.	"	69
5. Harnstoffempfindlichkeit der Gallinarum- phagen.	"	72
6. Thermoresistenz der Gallinarumphagen.	"	74
7. Inaktivierung der Gallinarumphagen durch Röntgenstrahlen.	"	76
a) Direkte Wirkung der Röntgenstrahlen auf Gallinarumphagen	"	78
b) Die indirekte Wirkung von Röntgen- strahlen auf Gallinarumphagen	"	79
IV. <u>Besprechung der Ergebnisse.</u>	"	82
V. <u>Zusammenfassung.</u>	"	86
VI. <u>Literaturverzeichnis.</u>	"	88
VII. <u>Lebenslauf.</u>	"	102

1. Einleitung.

Die bemerkenswerte Entdeckung der Bakteriophagen gelang T w o r t (125) und d' H é r e l l e (41) 1915 und 1917. Hierbei handelt es sich um ein Virus, das Bakterien infizieren und auflösen kann.

Es ist verständlich, daß schon d' H é r e l l e und nach ihm noch viele andere Autoren an dieses Phänomen große t h e r a p e u t i s c h e Hoffnungen knüpften. Zahllose experimentelle Untersuchungen über den Wert der Phagetherapie konnten diese Hoffnungen jedoch nicht rechtfertigen.

In neuerer Zeit haben Bakteriophagen als V i r u s m o d e l l innerhalb der Virusforschung große Bedeutung gewonnen. Die Bakteriophagen gehören zu den kleinsten bekannten Lebewesen und tragen somit alle wesentlichen Züge eines lebenden Organismus. Sie sind ein ideales Objekt für die Virusforschung, da sie geringe Ansprüche an die Züchtungstechnik stellen. Da Bakteriophagen zu außerordentlich rascher Vermehrung befähigt sind, benötigen sie für ihr Wachstum nicht - wie die tier- und pflanzenpathogenen Viren - die lebende Zelle, sondern die im Laboratorium leicht zu züchtenden Bakterien.

Von keineswegs geringerem Wert sind Bakteriophagen für den G e n e t i k e r, da sie ihre Eigenschaften auf ihre Nachkommen übertragen. So lassen sich beispielsweise durch simultane Infektion der gleichen Wirtszelle mit genetisch unterschiedlichen Phagen ein und desselben Typs Experimente ausführen, deren Verlauf der Mendelkreuzung höherer Organismen entspricht.

In der B a k t e r i o l o g i e finden Bakteriophagen bei der Differentialdiagnostik bakterieller Erkrankungen seit einigen Jahren in zunehmendem Maße Verwendung. Mit ihrer Hilfe gelingt es, auf relativ schnelle und sichere Art bestimmte Bakterien zu erkennen bzw. eine genaue Typenbestimmung vorzunehmen. Darüber hinaus konnte man definierte Serotypen von Bakterien durch adaptierte Bakteriophagen in eine Vielzahl von sogenannten Phagtypen unterteilen. Diese Entdeckung gelang C r a i g i e und Y e n (37) bei der Vi-Variante von *S. typhi*.

Nachstehende Arbeit befaßt sich speziell mit der Einwirkung von Bakterio-

phagen auf *S. gallinarum* (pullorum). *S. gallinarum* ist der einzige unbewegliche Salmonellatyp und verfügt daher lediglich über das O-Antigen; letzteres wird durch die Summenformel: 9, 12₁, 12₂, 12₃ charakterisiert. Dieser Salmonellatyp wird heute als Erreger der weißen Kükenruhr und des Geflügeltyphus allgemein anerkannt. Unabhängig davon unterscheidet man nach Edwards und Bruner (49) sowie nach Rotts (95) zwei Serotypen. Es handelt sich dabei einmal um Pullorumstämme, die das Teilantigen 12₂ reichlich besitzen, und andererseits um Stämme, die 12₂ nur in ganz geringem Umfang oder gar nicht aufweisen. Im Zusammenhang damit sollte weiterhin geprüft werden, ob diese Serotypen mit Hilfe von Bakteriophagen bestimmbar sind.

II. Literatur

A. Morphologie der Bakteriophagen.

Die Bakteriophagen sind kleinste Organismen mit einer Größe zwischen 10 und einigen Hundert μ . Sie sind im Elektronenmikroskop darstellbar, und ihre Form erinnert an die eines Spermiums oder eines sporentragenden Tetanusbazillus. Sie besitzen einen dunklen, kugel- oder eiförmigen Kopfteil und einen stäbchenförmigen Fortsatz. Daneben sind nach R o l l e (94) auch kugel- oder polstäbchenförmige Bakteriophagen beobachtet worden.

B. Chemische Struktur der Bakteriophagen.

Der Phage besteht aus einer Proteinhülle und der diese Hülle ausfüllenden Desoxyribonukleinsäure (DNS). Durch osmotischen Schock können Hülle und Desoxyribonukleinsäure voneinander getrennt werden. Es gelang T a y l o r (109), durch chemische Analyse in Phagenteilchen neben Protein und Nukleinsäure auch Fett in Form von Neutralfett nachzuweisen. Nach W e i d e l (130) liegt die DNS in Form langer Fäden vor, die im Kopfteil dicht gepackt sind. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich, daß die durch osmotischen Schock entstandenen leeren Proteinhüllen noch immer die für die Phagen typische Gesamtform haben. W e i d e l (132) bezeichnet diese Proteinhülle jedoch als nicht homogen, weil die Spitze des Phagenfortsatzes das Organ für die Anheftung des Phagen an die Wirtszelle beherbergt. Diese Anheftungssubstanz ist bis jetzt chemisch noch nicht untersucht, wohl aber die korrespondierenden Strukturen an der Bakterienzelle.

C. Verhalten von Bakteriophagen gegenüber chemisch-physikalischen Einflüssen.

B r o n f e n b r e n n e r und K o r b (14) erreichten durch Alkohol eine Zerstörung der lytischen Substanz zu 99,9% bei Zimmer- und Eisschranktemperatur innerhalb 15 Minuten. Im Präzipitat konnten nur noch 0,1 % aktives Substrat nachgewiesen werden. Das mit Alkohol versetzte Lysin wird bei Zimmertemperatur schneller zerstört als bei Eisschranktemperatur, was in einer späteren Arbeit (15) nochmals bestätigt werden konnte. Die durch Al-

kohol verursachte Phaginaktivierung führen Bronfenbrenner und Korb (16) darauf zurück, daß das lytische Agens an das durch die Alkoholeinwirkung gebildete Präzipitat adsorbiert wird, und nicht, wie d'Hérelle annahm, eine direkte Schädigung des Phagen darstellt.

Ein durch Alkohol präzipitierter Shigaphage zeigte nach Kochsalzextraktion die einem unbehandelten Phagen zukommenden Eigenschaften (Arnold und Weiss (3)).

Von Colwell (34) wurde ein Coliphage in ungereinigter und gereinigter Form gegenüber 95%igem Äthylalkohol geprüft. Dabei erwies sich der gereinigte Phage gegen die Inaktivierung widerstandsfähiger als der nicht gereinigte Phage.

Als eiweißfällende Substanzen sind weiterhin Lösungen von Schwermetallsalzen bekannt.

Watanabe (128) prüfte in seinen Versuchen die Wirkung einer 0,1-, 0,5- und 1%igen Sublimatlösung auf Bakteriophagen bei verschieden langer Einwirkungszeit. Dabei ergab sich eine auffallende Widerstandsfähigkeit von Phagen gegenüber Sublimat.

Proca (91) konnte zeigen, daß Bakterien gegenüber Sublimat wesentlich empfindlicher sind als Bakteriophagen. Bakteriophagenhaltige Colikulturen lassen sich bis zu 185 Tagen ohne Schädigung des lytischen Prinzips sterilisieren. Sobald bakteriophagenhaltige Colikulturen zuvor mit Sublimat in Kontakt gebracht werden, erleidet das lytische Prinzip bereits bei einer Temperatur von 56°C eine gewisse Schädigung.

Bear (6) vergleicht die Wirkung verschieden starker Sublimatlösungen auf ungereinigte bzw. gereinigte Phagen und kann dabei eine deutlich abgeschwächte Wirkung bei den gereinigten Phagen erkennen.

Besondere Beachtung verdient die Tatsache, daß durch Sublimat inaktiviertes Phagprotein seine antigenen Eigenschaften behält. Ôhashi (85) weist darauf hin, daß die Wirkung des Sublimats nicht von der Dosis, sondern von der Konzentration abhängig ist.

Ein durch Quecksilberchlorid vollständig inaktivierter Staphylokokkenbakteriophage erlangte durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff seine vollkommene

Aktivität wieder (K r u e g e r und B a l d w i n (69)).

Die Wirkung von Kupfersulfat auf Phagen beschreibt Ô h a s h i (85). Dabei ergaben sich gewisse Parallelen zur Sublimatwirkung, wenn auch der Wirkungsgrad geringer als der des Sublimats war.

Bakteriophagen können weiterhin von stark oxydierend wirkenden Stoffen inaktiviert werden. L o m i n s k i (70) z.B. inaktivierte Phagen mit Kaliumpermanganat schon in relativ schwachen Verdünnungen. Nach seiner Ansicht wird das lytische Prinzip durch die Einwirkung von Kaliumpermanganat oxydiert. In einer späteren Arbeit (71) beschreibt er, daß die Phagwirkung auch durch Ascorbinsäure stark beeinträchtigt werden kann. Dagegen erweisen sich homologe Bakterien gegenüber Ascorbinsäure weit weniger empfindlich. Durch analoge Untersuchungen mit Pyrogallol und Cystein gelangt er zu dem Schluß, daß die Phaginaktivierung mit dem Prinzip der Oxydoreduktion korrespondiert.

Auch der photodynamischen Wirkung verschiedener Farbstoffe gegenüber zeigen Bakteriophagen eine mehr oder weniger starke Empfindlichkeit. In den meisten Fällen wurden die Versuche mit Methylenblau durchgeführt. Die Inaktivierung von Phagen mit Methylenblau ist nur bei Gegenwart von Licht möglich.

S h w a r t z m a n (111) erblickt in der Inaktivierung von Phagen durch Methylenblau einen Reduktionsprozess. Das Methylenblau hemmt zunächst nur die lytische Tätigkeit seines Coliphagen, und erst in einer späteren Phase wird die Phagwirkung vollständig aufgehoben.

Zwei gegen Methylenblau empfindliche Staphylokokkenphagen beschreiben S c h u l t z und K r u e g e r (104). Bei einer Methylenblaukonzentration von 0,002 % wurden die Phagen in 6-12 Stunden inaktiviert. Eine ganze Anzahl weiterer Farbstoffe erwies sich allen getesteten Phagen gegenüber als unwirksam.

C l i f t o n und L a w l e r (33) konnten die Versuche von S c h u l t z und K r u e g e r bestätigen. Methylenblaulösungen in einer Konzentration von weniger als 0,005 % zeigten in der Regel gegenüber Phagen keine Wirkung. Ein Coliphage wurde jedoch weder von Methylenblau noch durch Toluidinblau

angegriffen. Clifton (32) erreichte bei Methylenblaukonzentrationen zwischen 0,1 und 0,01 % eine Inaktivierung von Staphylokokkenphagen bei 37°C innerhalb von 24 Stunden. Die Inaktivierung blieb aus, wenn Phage und Methylenblau getrennt vor der Bebrütung 5 Minuten lang mit indirektem Sonnenlicht belichtet wurden. Die anschließende Mischung von Phagen und Methylenblau sowie Bebrütung und spätere Prüfung auf Wirksamkeit wurden unter Lichtabschluß vorgenommen. Ebenso ließ sich die photodynamische Wirkung des Methylenblaus durch Zusatz eines Reduktionsmittels (z.B. Cystein) verhindern. Die durch Methylenblau verursachte Inaktivierung von Phagen ist also einer oxydierenden Wirkung zuzuschreiben und nur bei Gegenwart von Licht möglich.

In Perdrau und Todd's (88) Versuchen zeigen sich die Bakteriophagen gegenüber Methylenblaulösungen nur bei Lichteinwirkung und in Gegenwart von Sauerstoff empfindlich. Die optimale Farbstoffkonzentration betrug bei ihren Untersuchungen 1 : 100000. Sie vermuten, daß stärkere Konzentrationen wegen ihres Lichtadsorptionsvermögens weniger wirksam sind. Die inaktivierende Wirkung des Lichts ist an bestimmte Wellenlängen gebunden, die technisch ausschaltbar sind. Es gelang den Autoren nicht, durch Anwendung von Reduktionsverfahren Phagen zu reaktivieren. In einer weiteren Arbeit (89) wird über die Inaktivierung von Virusarten durch Methylenblau berichtet. Die meisten Virusarten werden in gleicher Weise wie die Bakteriophagen durch die photodynamische Wirkung des Methylenblaus inaktiviert. Einige jedoch, wie z.B. das Virus der Maul- und Klauenseuche, sind widerstandsfähiger und benötigen für ihre Inaktivierung eine größere Lichtmenge. Lebende Körperzellen können Viren - ebenso wie anwesende lebende Bakterien Bakteriophagen - gegenüber der Inaktivierung durch Methylenblau schützen.

Burnet (30) prüfte Coliphagen, deren Zugehörigkeit zu verschiedenen serologischen Typen er zuvor festgestellt hatte, auf ihr Verhalten gegenüber Methylenblau, ihre Lysebefähigung bei Gegenwart von Zitrat und die Verträglichkeit gegenüber starken Harnstofflösungen. Die Coliphagen verhalten sich, unabhängig von ihrer serologischen Typenzugehörigkeit, bei den 4 Proben ganz verschieden. Daraus schließt er, daß nicht nur die Phagen verschiedener Bakterienarten, sondern auch die einzelnen Phagstämme einer bestimmten Bakterienart weitgehende Unterschiede zeigen.

Zahlreich sind die Versuche, die sich auf die pH-Resistenz der Bakteriophagen beziehen. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Phagen liegt im pH-Bereich von 7,0 bis 8,0. Aber die meisten zeigen sowohl bei tieferer als auch bei höherer Wasserstoffionenkonzentration noch volle Wirksamkeit.

So berichtet S c h e i d e g g e r (99), daß selbst eine Wasserstoffionenkonzentration von pH 4,5 das lytische Agens innerhalb mehrerer Stunden nicht schädigt, sofern die Temperatur 20 - 37° C beträgt. Bei einer Temperatur von 56° C wird die Phaglösung bei gleichem pH-Wert in 2 Stunden vollständig zerstört.

D a C o s t a C r u z (38) konnte hingegen bei einem Shigaphagen in saurem Milieu keine Lysefähigkeit mehr nachweisen.

Von S h w a r t z m a n (110) wurde ein Coliphage in Pufferlösungen von pH 2,8 bis pH 4,8 suspendiert. Nach 48 Stunden Aufenthalt bei Zimmertemperatur zeigte sich, daß der Bakteriophage bei pH 2,8 bis pH 3,6 vollständig, von pH 3,8 an teilweise inaktiviert wurde. Bei pH 4,2 abgeschwächte Phagen erreichten nach zahlreichen Passagen wieder volle Wirksamkeit.

Die Wasserstoffionenkonzentration, die die Phagaktivität limitiert, ist nicht mit der der korrespondierenden Bakterien identisch, wie S i e r a k o w s k i und Z u b l i d o w s k y (112) feststellen konnten.

S e i f f e r t (106) gibt für die Aktivität der Phagen einen Bereich von pH 2,5 bis pH 8,5 an. Unter und über diesen Grenzwerten sollen Phagen schnell zerstört werden.

Ähnlich wie Bakterien und Virusarten können auch die Bakteriophagen durch Formalin inaktiviert werden.

So konnten F r i s b e e und M a c N e a l (54) die inaktivierende Wirkung von Formaldehyd auf im Harn vorkommende Phagen nachweisen. Nach ihrer Feststellung schädigt Formalin Phagen schon in einer Konzentration, die Colibakterien noch nicht beeinflußt.

S c h u l t z und G e b h a r d (103) gelang es, einen durch Formalin inaktivierten Staphylokokkenbakteriophagen durch bloßes Verdünnen mit Wasser zu reaktivieren.

Die Einwirkung von Formol in verschiedenen Konzentrationen auf Staphylokokken-

phagen hat W a h l (127) geprüft und dabei festgestellt, daß die Inaktivierung durch Formol der durch Sublimat entspricht. Auch W a h l kommt zu dem Ergebnis, daß durch niedere Formalinkonzentrationen inaktivierte Phagen sich wieder reaktivieren lassen. Bei Verwendung hoher Formalinkonzentrationen jedoch ist eine Reaktivierung nicht mehr möglich.

M o r i y a m a und Ôhashi (82) sehen in dem Inaktivierungsvorgang von Phagen mit Formaldehyd eine monomolekulare Reaktion. Die Wirkung ist direkt proportional der Formalinkonzentration, der absoluten Formalinmenge hingegen kommt keine ausschlaggebende Bedeutung zu. Der größte Teil (etwa 95%) des Formaldehyds ist so an das Eiweiß angelagert, daß es durch Jod zurückgeführt werden kann. Etwa nur 5% des ganzen Formaldehyds sind fest mit dem Phageneiweiß verbunden. Schon eine 0,01%ige Formalinkonzentration führt mit Sicherheit zur Phaginaktivierung. Sie behaupten, daß die inaktivierende Wirkung des Formalins der Vermehrung der OH-Ionen zuzuschreiben sei, und bestätigen somit die Feststellungen von S c h u l t z und G e b h a r d, daß die mit Formalin inaktivierten Phagen durch Verdünnen mit Wasser oder durch Dialyse manchmal reaktiviert werden können. Phagen, die durch Formalin nur teilweise inaktiviert wurden, haben manchmal nur noch die Fähigkeit, kleinere "plaques" zu bilden. Demnach wird die Virulenz von Phagen durch Formalineinwirkung verringert. Da es sich hier um eine erworbene Eigenschaft handelt, findet eine Vererbung nicht statt.

Nach Entfernung der Calciumionen im Nährboden zeigen gewisse Phagen keinen Lyseeffekt. Dieses Phänomen hat zu einer Einteilung in zitratempfindliche und zitratunempfindliche Phagen geführt.

S t a s s a n o und de B e a u f o r t (120) gelang es, durch Zusatz von 0,5 - 1 ml n/2 Natriumzitrat zum Nährboden die Bakteriolyse zu unterbinden. Kontrollkulturen ohne Zitratzusatz oder solche Kulturen, in denen Natriumzitrat durch gleichzeitigen Zusatz von Calciumchlorid seiner calciumbindenden Wirkung beraubt war, zeigten vollständige Lysis. Die Autoren sehen in dem Vorgang der Bakteriolyse ein Verdauungsphänomen, bei welchem dem lytischen Prinzip die Rolle eines Katalysators zukommt. In gleicher Weise äußern auch Verdauungsfermente nur in Gegenwart von Calcium-Ionen volle Wirksamkeit.

A s h e s h o v (4) betont jedoch, daß die Versuche von S t a s s a n o

und d e B e a u f o r t über die Wirksamkeit der Bakteriophagen in Abhängigkeit von Natriumzitatrat nicht verallgemeinert werden dürfen. Bestimmte Phagen können auch ohne Gegenwart freier Calcium-Ionen Bakterien lösen. Es gelang ihm, Phagen an Calcium-Ionen-freie Medien so zu adaptieren, daß auch in diesem Milieu Phagaktivität nachgewiesen werden konnte. In diesem Zusammenhang wird ausdrücklich darauf hingewiesen, daß sich nur die Bakteriophagen und nicht die Bakterien ändern. Sehr kleine Mengen von Natriumzitatrat sollen sogar die Bakteriolyse steigern. Diese Beobachtung wurde vor allem bei solchen Phagen gemacht, die sich an ein Calcium-Ionen-freies Milieu gewöhnt hatten.

Auch B u r n e t (30) prüfte serologisch differenzierte Coliphagen in Gegenwart von Natriumzitatrat auf Vorhandensein aktiver Phagpartikel. In den meisten Fällen behielten die Phagen auch in Gegenwart von Zitratsalzen ihre Aktivität uneingeschränkt bei. Nur wenige Phagen büßten in Gegenwart von Zitratsalzen ihre lysogenen Eigenschaften vollständig ein. Bei steigendem Zitratzusatz ließ sich eine Verminderung der Plaquesbildung feststellen. Das Verhalten von Phagen in Gegenwart von Zitratsalzen korrespondiert dabei nicht mit den durch B u r n e t definierten serologischen Coliphagtypen.

Unter bestimmten Versuchsbedingungen kann nach B r o n f e n b r e n n e r und H e l l e r (13) die Phagwirkung in Gegenwart von Harnstoff verstärkt werden. Selbst auf hochprozentigem (4 - 5%igem) Agar, der im allgemeinen eine Bakteriolyse nicht ermöglicht, kann bei Anwesenheit von Harnstoff das Phagphänomen ablaufen. Nach ihrer Meinung wird durch das starke Wasserbindungsvermögen eines hochprozentigen Agars den Bakterien die Wasseraufnahme entzogen. Infolgedessen unterbleibt bei den Bakterien der normale Quellungsvorgang, und es besteht keine Möglichkeit für sie, in der letzten Phase des Phagphänomens zu platzen. In Anwesenheit von Harnstoff kann die Wasserbindungsfähigkeit von Agar unterbunden werden, wodurch ein Quellen und nachfolgendes Platzen der Bakterien wieder möglich wird.

Die variable Größe der Phagpartikel bedingt nach B u r n e t (30) eine unterschiedliche Harnstoffempfindlichkeit. In seinen Versuchen erwiesen sich die großen Phagpartikel dem Harnstoff gegenüber empfindlicher als die kleinen.

Eine große Zahl weiterer Arbeiten beschäftigt sich mit der Chemoresistenz von

Bakteriophagen. Einzelne Ergebnisse, die für die Gewinnung, Vermehrung und Aufbewahrung der Phagen Bedeutung haben, sollen weiter unten erwähnt werden.

N a k a m u r a (83) beschreibt, daß Shigaphagen bei einer Temperatur von 37°C durch Gelatine in ihrer Vermehrungsfähigkeit beeinträchtigt werden, während dieselben Phagen unter sonst gleichen Bedingungen in Fleischbrühe volle Wirksamkeit zeigen.

Nach Mitteilung von D o e r r und B e r g e r (44) können nicht nur Gelatine, sondern auch Agar und andere Kolloide den Ablauf der Bakteriophagenreaktion behindern. Dabei soll die antagonistische Wirkung mit steigender Konzentration zunehmen.

Weiterhin werden viele Bakteriophagen durch Galle in ihrer Wirkung beeinträchtigt. H a u d u r o y (62) beschreibt dieses Verhalten bei Typhusbakteriophagen und erklärt damit die optimalen Züchtungsbedingungen für Typhusbakterien in Gallenährböden.

Die Tenazität von Bakteriophagen wurde ferner in Gegenwart zahlreicher Desinfektionsmittel geprüft. W o l f f und J a n z e n (137) brachten Bakterien-Phaggemische mit verschiedenen wachstumshemmenden Substanzen wie Chininabkömmlingen, Rivanol und Malachitgrün in Kontakt. Dabei konnten sie feststellen, daß in dieser Form vorbehandelte Phagen ihre Fähigkeit zur Plaquesbildung verlieren. Sobald jedoch ein Tropfen der Bakterien-Phagmischung nach Zusatz eines wachstumshemmenden Substrats einer frischen Bakterienkultur zugegeben wurde, trat dabei typische Plaquesbildung auf. Dieser Versuch beweist, daß Phagen in Gegenwart hemmender Substanzen keineswegs zerstört, sondern nur statisch beeinflusst werden. Nach ihren Untersuchungen soll die Anwesenheit schwacher Konzentrationen von Antiseptika (z.B. Chinosol 1:4000) die Bakteriophagen sogar anregen (Arndt-Schulz-sches biologisches Grundgesetz).

Aus den von W a t a n a b e (128) durchgeführten Desinfektionsversuchen mit Bakteriophagen ergibt sich, daß die Widerstandskraft von Bakteriophagen etwa in der Mitte zwischen Bakterien und Bazillensporen steht. Es ist naheliegend, daß der Desinfektionserfolg im wesentlichen zugleich eine Funktion der Phagkonzentration ist.

Die Wirkungsweise und den Wirkungsgrad verschiedener Bakterienhemmstoffe

(Kristallviolett, Gentianaviolett und Brillantgrün) auf verschiedene Phagen prüften Wells und Sherwood (136). Sie testeten dabei Phagen für *Shigella dysenteriae* (Shiga-Kruse), *S. typhi*, *B. megatherium*, *E. coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, Micrococcen und konnten Verhaltensunterschiede zwischen Bakteriophagen grampositiver und gramnegativer Bakterien feststellen. Dabei erwiesen sich auf gramnegative Bakterien wirksame Phagen widerstandsfähiger als Phagen grampositiver Bakterien.

Zaytzeff - Jern und Frank (140) untersuchten die Wirkung der ersten Sulfonamide: Prontosil, Prontalbin und Sulfapyridin in 0,5 - 1 %igen Lösungen auf Bakteriophagen. Sie konnten in ihren Versuchen keine Hemmung, sondern eher einen fördernden Einfluß auf die Phagentätigkeit feststellen. Weiterhin zeigten die Phagen verschiedener Bakterien unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den angewandten Chemotherapeutika.

Auch physikalische Einflüsse können als Maß für die Widerstandskraft von Phagen bewertet werden. Es handelt sich dabei vor allem um die Wirkung von höheren Temperaturen, Röntgenstrahlen und ultraviolettem Licht.

So konnte de Necker (84) nachweisen, daß Temperaturen bis 48°C für Bakteriophagen unschädlich sind, während Wärmegrade zwischen 48 und 60°C die Phagaktivität mindern, und solche über 70°C die Phagaktivität sehr schnell zum völligen Erlöschen bringen.

Unterschiedliche Thermoresistenz hingegen zeigten die von Otto und Winkler (87) geprüften artspezifischen Phagen.

Doerr und Rose (46) variierten die Versuchsbedingungen bei der Prüfung der Thermoresistenz von Phagen. Dabei zeigte sich, daß Phagen infolge Hitzeeinwirkung in verschlossenen Ampullen viel rascher als in offenen Reagenzgläsern ihre Aktivität einbüßen. Auch sie konnten bei verschiedenen Phagen die unterschiedliche Resistenz gegenüber der Wärme bestätigen. So wurden z.B. Coliphagen in Ampullen schon bei 70°C, Shigaphagen dagegen erst bei 75°C vernichtet. Nach Verdünnung der Phagbouillon mit destilliertem Wasser nimmt die Empfindlichkeit gegenüber Temperaturen derart zu, daß schon bei Erwärmen auf 56°C die Phagen nach 1 Stunde völlig zerstört sind.

Watanabe (128) schlägt vor, Phagen entsprechend ihrer Thermoresistenz einzuteilen. Nach seinen Feststellungen zeigen mehrere Bakteriophagenstämme mit verwandten Eigenschaften auch gleiche Hitzeempfindlichkeit.

Andere Phagen mit Aktivität gegenüber ein und derselben Bakterienart wiesen auffallende Differenzen auf.

Die Einwirkung höherer Temperaturen auf Phagen trat nach G r i g o r i e f f und W o l l m a n (58) zunächst nur durch Verminderung der Plaqueszahl in Erscheinung, während die Größe der Löcher konstant blieb. Erst wenn die Inaktivierungstemperatur erreicht ist, bleibt die Lyse aus.

D'H é r e l l e und S e r t i c (43) gelang es, durch allmählich steigende Erwärmung die Hitzeresistenz von Bakteriophagen zu erhöhen. Die Gewöhnung an höhere Temperaturen geht im allgemeinen wieder verloren, wenn nur wenige Generationen von Phagen adaptiert waren. Durch weitere Adaptation über viele Generationen wird die Hitzeresistenz jedoch zur konstanten Eigenschaft.

Durch Erhitzen mit gewissen Abständen läßt sich der von J a d i n (67) verwendete Choleraphage soweit anpassen, daß er im Laufe der Zeit wesentlich mehr Hitze verträgt als vorher, ohne inaktiv zu werden. Vor dem Adaptationsversuch wurde das Lysin bei 1/2 stündigem Erhitzen auf 65°C zerstört, während es nachher 1/2 stündiges Erhitzen auf 75°C ohne Schaden vertrug.

Zu bemerkenswerten Ergebnissen kam V e d d e r (126). Nach seinen Untersuchungen können Phagen in trockenem, wasserarmem Milieu Temperaturen bis zu 100°C vertragen. In flüssigen Medien hingegen werden identische Phagen bei diesen Temperaturen vollständig inaktiviert.

Durch Zusatz von Calciumchlorid in der Konzentration von 0,002 bis 0,015 zur Phagsuspension soll nach B r o n f e n b r e n n e r (12) ein gewisser Schutz der Phagen gegen Hitzeinaktivierung erreicht werden.

H e i b e r g (63) prüfte die Thermoresistenz bei "jungen" und "alten" Bakteriophagen, konnte aber keine Unterschiede feststellen.

Das thermische Verhalten von 3 Staphylokokkenphagen, einem Typhus- und einem Dysenteriephagen untersuchte G ü l l e r (59). Dabei konnte er feststellen, daß die Staphylokokkenphagen sehr viel empfindlicher gegen Erhitzen sind als die von ihm ebenfalls geprüften Phagen gegen gramnegative Bakterien. Er zieht daraus den Schluß, daß die Trennung von Staphylokokkenphagen aus einer Bakterien-Phag-Mischung nicht durch Erhitzen erfolgen kann, wie dies zur Trennung von gramnegativen Bakterien und den zugehö-

rigen Phagen möglich ist.

Durch Verwendung von Röntgenstrahlen, ultraviolettem Licht und ionisierenden Strahlen können Phagen inaktiviert werden. Unter Inaktivierung versteht man in diesem Falle, daß das Phageteilchen sich nicht mehr vermehren kann, und so die für uns sichtbare Plaquesbildung ausbleibt. Der Einfluß der Strahlen auf Bakteriophagen wird in Form von Inaktivierungskurven dargestellt. Man versucht, die Wirkungsweise von Strahlen mit empfindlichen Bereichen im Phagen zu erklären, die durch Einwirkung eines Lichtquantums so verändert werden, daß der betreffende Phage inaktiv wird. Die Inaktivierung ist eine einfache Exponentialfunktion der Bestrahlungsdosis. Die Zahl der überlebenden Phageteilchen nimmt somit streng exponentiell mit der eingestrahlenen Dosis ab.

L u r i a (72) gelang es, durch Strahlenwirkung inaktivierte Phagen unter der Voraussetzung zu reaktivieren, daß Bakterien gleichzeitig mit verschiedenen, durch Strahlen inaktivierten Phagen infiziert werden. Diese überaus interessante Entdeckung machte L u r i a bei der Kreuzung nahe verwandter, durch ultraviolettes Licht abgetöteter Phagen, wobei er eine lebensfähige Nachkommenschaft erhielt. Nach D e l b r ü c k (40) soll hierbei eine Wiedervereinigung der durch die Bestrahlung zerbrochenen DNS-Ketten erfolgen, und zwar so, daß zwei oder mehrere Teilchen sich wieder zu einer neuen DNS-Kette vereinigen. Am deutlichsten sei diese Reaktivierung gerade bei denjenigen Phagen, die auch in der Fortpflanzung besonders aktiv sind.

B e c k w i t h, O l s o n und R o s e (7) stellten bei röntgenbestrahlten Coliphagen verminderte Aktivität gegenüber einzelnen Colistämmen fest; demgegenüber zeigten dieselben Phagen bei anderen Colistämmen gleiche Aktivität wie vor der Bestrahlung.

Phag-Inaktivierungsversuche mit Röntgenstrahlen wurden auch von W o l l m a n und L a c a s s a g n e (138) durchgeführt. Sie ordneten in einer weiteren Arbeit (139) die Bakteriophagen nach ihrer Strahlenempfindlichkeit, da sie feststellen konnten, daß die kleinsten Phagen der Bestrahlung am längsten Widerstand leisten. Bei vergleichenden Untersuchungen über Strahlenempfindlichkeit bei Dysenteriephagen beobachteten sie, daß rund 80% des Phagen C 16 durch eine Röntgendosis von 21000 r inaktiviert wurden, während für den Phagen S 13 825000 r erforderlich waren. Der Phage C 16 hatte eine Größe von $50 - 75\mu$, während der Phage S 13 nur $10 - 12\mu$ maß.

L u r i a und E x n e r (74) prüften die Phaginaktivierung durch Röntgenstrahlen bei Benützung verschiedener Lösungsmittel. Dabei ergab sich, daß die inaktivierende Wirkung von Röntgenstrahlen von der Art des Lösungsmittels abhängig ist. Sie unterscheiden daher eine indirekte und eine direkte Form der Inaktivierung. Die indirekte Wirkung auf Bakteriophagen kann nur in synthetischen Nährmedien geprüft werden. Dabei enthält das Substrat keinelei Stoffe, die in der Lage sind, suspendierte Phagen zu schützen. Ein gewisser Schutz könnte schon durch Zugabe kleiner Mengen fremden Eiweißes gewährleistet werden. Bei der indirekten Wirkung unterscheiden L u r i a und E x n e r zwei Agentien, und zwar kurzlebige, die nur während der eigentlichen Bestrahlung der Phagsuspensionen nachzuweisen sind, und relativ langlebige, die auch über die Strahlungsperiode hinaus noch wirksam sind. Als Maß der Langlebigkeit dient die phaginaktivierende Wirkung zuvor bestrahlter Stoffe. L u r i a und E x n e r verdünnten beispielsweise Phagfiltrate 1 % in Aqua dest. Dabei konnten sie feststellen, daß die Inaktivierung mittels Röntgenstrahlen hierdurch schnell zunimmt.

In weiteren Versuchen beweisen die Autoren, daß eine definierte Röntgendosis in Bouillon suspendierte Phagen nur zu 60% inaktiviert. Sobald das Phagfiltrat jedoch 1 : 1000 mit Aqua dest. verdünnt wurde, erzielten sie mit der gleichen Dosis eine Schädigung der Partikel von 99 %. Phagen in verschiedenen Salzlösungen und in Phosphatpuffer suspendiert, zeigten dieselbe Strahlenempfindlichkeit wie die Wassersuspensionen. Auch Zuckerlösungen erwiesen sich bei der Bestrahlung als nichtschützende Agentien.

Die direkte Wirkung erhält man, wenn die Phagen während der Bestrahlung in einem schützenden Medium, wie z.B. Gelatine, Bouillon oder Albuminen suspendiert sind. Die Inaktivierung ist hier die Folge der Adsorption der Strahlenenergie innerhalb des Phagteilchens selbst. L u r i a und E x n e r definieren als Minimalempfindlichkeit die Empfindlichkeit von in Bouillon suspendierten Phagen gegenüber Röntgenstrahlen.

Von L u r i a und E x n e r aufgezeichnete Inaktivierungskurven, die in Form von Überlebenskurven dargestellt sind, zeigen einen geraden Verlauf. Man trägt dabei den Logarithmus des Bruchteils noch aktiver Teilchen nach einer Strahlendosis r ein. Der Prozentsatz der verbleibenden Phagen ist also eine Funktion der Röntgendosis r . Während die Inaktivierungskurve verschiedener Phagen sehr verschieden sein kann, ist die Röntgenstrahlenempfindlichkeit ein und desselben Phagen eine höchst spezifische Eigenschaft, die auch nach

vielen Jahren reproduzierbar ist. Zwei Phagen desselben Ursprungs zeigen also dieselbe Inaktivierungskurve, auch wenn sie viele Jahre in verschiedener Umgebung gehalten wurden. L u r i a und E x n e r glauben, durch die Verwendung von Bestrahlungsmethoden Aufschlüsse über die Größe der ultramikroskopischen Strukturen zu erhalten.

Die Eigenschaften röntgeninaktivierter Phagen wurden durch W a t s o n (129) näher geprüft. Er benützte für seine Experimente die Coliphagen $T_1 - T_7$ und das spezifische Wirtsbakterium *Escherichia coli* B. Auch er bestätigte, daß der Inaktivierungsgrad für Phagen bei Röntgenstrahleneinwirkung von der Art des Mediums abhängig ist, in welchem der Phage gelöst wurde. In dem von ihm benützten synthetischen Medium wird der Phage T_2 viel schneller inaktiviert als bei Lösung desselben Phagen in Bouillon, was er auf die Ionisation des umgebenden Mediums zurückführt. Die Inaktivierungskurve für den Phagen T_2 ergibt bei seiner Lösung in Bouillon eine gerade Linie. Bei Lösung des Phagen in synthetischem Medium zeigt die Kurve bei niederen Bestrahlungsdosen eine nach abwärts gerichtete Konkavität, die erst bei höheren Dosen gerade wird. Durch die Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Phagen können einige spezifische Eigenschaften der Phagen - wie z.B. die Fähigkeit, das Wirtsbakterium zu töten, oder die Fähigkeit, andere Phagtypen zu interferieren - verloren gehen. Die Adsorptionsfähigkeit von Phagen an Bakterien hingegen bleibt erhalten. Durch Strahleneinwirkung scheinen Phagen nur teilweise geschädigt zu werden, da innerhalb der Virusvermehrung nur eine bestimmte Entwicklungsstufe blockiert wird. Durch Strahleneinwirkung ist es also möglich, Phagen in definierten Bereichen zu schädigen und damit ihre Neubildung in verschiedenen Stadien zu blockieren. Diese Tatsache bildet die Grundlage für Untersuchungen von W a t s o n über die Beziehungen zwischen Wirt und Phage beim Ablauf der Phagreaktion; dadurch gelang es ihm, die Adsorption und Invasion als wesentliche Stufen in der Frühperiode der Phagvermehrung eingehender zu studieren.

D. Entwicklungszyklus der Bakteriophagen.

Der Lebenszyklus von Bakteriophagen scheint in einfacher Weise abzulaufen. In der ersten Phase kommt es zu einer Anheftung von Bakteriophagen an die Bakterienmembran. Erst unter dieser Vorbedingung gelingt es definierten Substanzen des Phagen, in das Bacterium selbst einzudringen. Im Innern der

Bakterien findet die Reduplikation von Phagpartikeln statt. Unter Beteiligung der Bakterienzelle werden so infektionstüchtige Phagen gebildet, die im letzten Stadium eine Lysis des Bacteriums herbeiführen.

1. Adsorption zwischen Bakteriophagen und Bakterien.

Nach D e l b r ü c k (39) besteht die Anheftung des Phagen an das Bacterium in einer physikalischen Adsorption, die mit einer Reihe von Reaktionen gekoppelt ist. Erst auf dieser Grundlage ist es dem Bakteriophagen möglich, in das Bacterium einzudringen. Die physikalische Adsorption zwischen Bakteriophage und Bacterium bedingt die Spezifität der Reaktion. Eine spezifische Adsorption kann nur dann eintreten, wenn eine der Anheftungssubstanz des Phagen komplementäre Rezeptorsubstanz am Bacterium vorhanden ist.

Auch schon M a r c u s e (76) und B u r n e t (25) haben durch ihre Versuche bewiesen, daß für das Zustandekommen einer Phagwirkung am Bacterium die Gegenwart einer entsprechenden, bakteriellen Rezeptorsubstanz notwendig ist.

Weiterhin beobachtete B u r n e t (27), daß Bakterien, die sich bei serologischen Untersuchungen ähnlich verhielten, auch von den gleichen Bakteriophagen angegriffen wurden. So zeigen von ihm gefundene Bakteriophagen spezifische Affinität zu Salmonellatypen, die über das O-Antigen 9 verfügen. Salmonellatypen anderer serologischer Gruppen hingegen werden nicht angegriffen. B u r n e t (26) erkannte weiterhin, daß Phagaktivität gegenüber S-Form-Bakterien bei R-Form-Bakterien verloren geht.

Die spezifische Affinität zwischen Phagen und bestimmten Bakterientypen bestätigen S e r t i c und B o u l g a k o w (108), C r a i g i e (36) und S c h o l t e n s (102). Die genannten Autoren fanden Bakteriophagen, die in spezifischer Weise nur die Vi-Form der Typhusbakterien angreifen. Diese Phagpräparationen sind heute als sog. Vi-Phagen allgemein bekannt.

A l m o n und S t o v a l l (2) vermuten, daß der Angriffspunkt von Phagen mit bestimmten Molekülgruppen in der Bakterienmembran identisch ist. Dabei verweisen sie auf die Parallelität zwischen Vi-Phagenempfindlichkeit und Vi-Agglutinierbarkeit bei Typhus-Vi-Bakterien.

H a a r d i c k (60) erblickt in der Bindung des Phagen an das Bacterium

eine Elektroadsorption. Nach seiner Vorstellung sind die Haftpunkte an der Bakterienoberfläche bzw. die Anheftungssubstanz des Phagenfortsatzes positiv geladen. Weiterhin wird die Bindung zwischen lebenden Bakterien und Phagen als reversibel und labil angesehen. H a a r d i c k glaubt, daß die in der Bakterienoberfläche vorhandenen Phagerezeptoren Globulinnatur besitzen. Die Bindungsstärke bei der Reaktion zwischen Phage und Bacterium ist nach seiner Ansicht eine spezifische Eigenschaft des jeweiligen Phagenstammes.

B i l l a u d e l l e (11) versuchte, durch bestimmte Isolierungsmethoden das Antigen aus dem Bakterienorganismus herauszulösen. Auf diese Weise sollte die Reaktion zwischen Bakteriophagen und isolierter Substanz untersucht werden. Er benützte hierzu die kohlenhydrathaltigen Antigene der Ruhrgruppe sowie Typhus-Vi-Antigene und die homologen Phagen. Er kommt zu dem Schluß, daß jeder Phage innerhalb einer bestimmten Bakterienart seinen fest umrissenen Aktionsradius besitzt. B i l l a u d e l l e sieht nicht wie H a a r d i c k im Adsorptionsvorgang die spezifische Reaktion zwischen Phage und homologem, bakteriellern Rezeptor. Nach seiner Vermutung sind derartige Bindungen anderer Natur, und es müssen noch bestimmte Umsatzreaktionen folgen. In diesem Zusammenhang weist er darauf hin, daß die bakteriellen Rezeptoren chemisch Glukolipoide darstellen. In einer weiteren Arbeit (10) macht er beispielsweise für die Bindung des Vi-Phagen an das Bacterium das Vi-Antigen verantwortlich. Den Phagen anderer Bakterientypen korrespondiert das entsprechende O-Antigen. Der Eintritt des Phagen in die Bakterienzelle wird nach seiner Ansicht erst dann möglich, wenn eine Depolymerisation der Haftsubstanz vorausgeht.

Es ist das große Verdienst von G o e b e l (56) und W e i d e l (131), die chemische Struktur der für die Adsorption so bedeutsamen, bakteriellen Rezeptoren aufgeklärt zu haben. Die Anheftungssubstanz, die in der Schwanzspitze des Bakteriophagen lokalisiert zu sein scheint, war bisher experimentellen Untersuchungen noch nicht zugänglich. W e i d e l (131, 133, 134, 135) und seine Mitarbeiter zerlegten die Zellwand von E. coli B in einzelne Komponenten und wiesen charakteristische chemische Zusammensetzung nach. Jedem der verschiedenartigen chemischen Bausteine entspricht ein bestimmter Rezeptor, der wiederum nur mit einem Phagen aus der Coli T-Phagenreihe reagiert. Durch verschiedene chemische Eingriffe gelingt es, bestimmte Rezeptoren am Bacterium zu zerstören, in Lösung zu bringen oder andere zu erhalten. Die nach der jeweiligen chemischen Behandlung in Lösung gebrachten Rezeptorsubstanzen für die Coli T-Phagen konnten sogar teilweise ihrem chemischen

Aufbau nach bestimmt werden.

2. Vermehrung von Bakteriophagen in Bakterien.

Der Adsorption folgt der eigentliche Eintritt des Phagen in das Bacterium. Dieser Vorgang wird dadurch präzisiert, daß eigentlich nur die Phagnukleinsäure (DNS) in das Bacterium eindringt, während die Proteinhülle des Phagen außerhalb der Zellwand verbleibt. Die Hülle kann sogar entfernt werden, ohne daß dies die Phagvermehrung stört. Das Hüllenprotein des Phagen ist also an der Vermehrung nicht beteiligt, sondern die DNS ist allein verantwortlich für die Weitergabe des genetischen Materials an die Tochtergeneration.

Das infizierende Phageteilchen wird nach der Adsorption zunächst so tiefgreifend verändert bzw. derart in seine Bestandteile zerlegt, daß es während einer bestimmten Latenzzeit auch beim künstlichen Aufbrechen des Bacteriums den üblichen Nachweismethoden entzogen ist. Bakteriophagen sind also in der ersten Phase der intrabakteriellen Reduplikation inaktiv. Analoge Verhältnisse finden sich bei der Virusvermehrung, ein Stadium, das dort als Eklipse bezeichnet wird. Auch die Virusarten lassen sich nach der Infektion zunächst nirgends in der Wirtszelle mehr nachweisen. Erst nach Ablauf einer bestimmten Latenzzeit gelingt es wieder, vollkommen infektiösfähige Virus- resp. Phagenteilchen zu isolieren.

Einige Phagen benötigen bei dem Adsorptions-Invasionsprozeß gewisse Ko-Faktoren (Anderson (1)). Diese Eigenschaften besitzt beispielsweise Tryptophan, das in minimaler Konzentration bestimmte Phagen zu aktivieren im Stande ist. Tryptophan kann durch einige Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Norleucin) ersetzt werden, während sich Indol als Antagonist erweist.

Durch den Eintritt der Phagen-DNS in die Wirtszelle wird deren Stoffwechsel nicht wesentlich verstärkt, jedoch in ganz andere Bahnen gelenkt; die Bakterienzelle produziert nunmehr statt des zelleigenen Aufbaumaterials Phagnukleinsäure und Phagenprotein. Besonders auffallend ist die Umstellung im Nukleinstoffwechsel, der von Cohen (35) untersucht wurde. Hierbei zeigte sich eine bedeutende Produktionssteigerung von DNS. In der gesunden Bakterienzelle verhält sich die Erzeugung von Ribonukleinsäure (RNS) und Desoxyribonukleinsäure (DNS) wie 3 : 1. Die infizierten Zellen hingegen bilden fast nur DNS. Durch Versuche mit Isotopen ist es sogar möglich, den Ursprung der

Bausteine für die neue Phagengeneration zu bestimmen. Sie stammen zunächst aus der Bakterienzelle und werden später über die Bakterienzelle aus dem Nährmedium entnommen. Die Beteiligung des Nährmediums am Aufbau der neuen Phagengeneration ist sogar so groß, daß mehr als die Hälfte des in die neue Phagengeneration eingebauten Stickstoffs, Kohlenstoffs und Phosphors aus dem Nährmedium stammt. Während die neugebildete Phagennukleinsäure erst in der zweiten Hälfte der Latenzzeit - und zwar gleichzeitig mit den ersten aktiven Phagen - auftritt, wird das spezifische Phagenprotein schon sogleich nach der Phageninvasion gebildet. Das von der Bakterienzelle gelieferte Phagenprotein ist phagspezifisch. Nach Auflösung der Wirtszelle bedingt das Protein in Verbindung mit DNS dann die Infektionsfähigkeit des Phagen. Die so gebildeten neuen Phagen sind im allgemeinen mit den infizierenden Phagen identisch.

3. Mutationen von Phagen.

Bei der Vermehrung von Bakteriophagen bleibt die Kontinuität des Phagentyps nicht in allen Fällen gewahrt. Es können nach L u r i a (73) Phagen auftreten, die veränderte Eigenschaften besitzen. Diese plötzliche Änderung von Eigenschaften entspricht der Mutation bei höheren Organismen. Die durch Erbsprung entstandenen Eigenschaften bleiben erhalten und werden weiter vererbt. Mutationen treten nicht in aufbewahrten Phagsuspensionen, sondern nur in der Vermehrungsphase des Phagen auf. Sie sind nur dann existenzfähig, wenn auch durch Veränderung der Umgebung die für sie notwendigen Lebensbedingungen geschaffen werden. Die durch Mutation entstandenen Phagen können u.U. für den Ausgangsphagen resistente Bakterien angreifen. Wenn zwei verwandte Phagentypen eine Bakterienzelle infizieren, dann entstehen bei der Vermehrung neben Teilchen, die den infizierenden Phagen entsprechen, auch solche, die ganz neue Eigenschaften besitzen. Dies ist nur bei Phagen mit zusammengesetzten erblichen Eigenschaften möglich, da hier ein Austausch gewisser erblicher Eigenschaften (Genaustausch) erfolgt.

4. Interferenz der Phagen.

Sobald eine Bakterienzelle von zwei Phagen infiziert wird, kann es vorkommen, daß nur ein Phage sich vermehrt. Der zweite Phage kann adsorbiert

werden, läßt sich aber nach der Bakteriolyse nicht mehr nachweisen. Solche Interferenzerscheinungen sind wohl bekannt, aber noch nicht zu erklären. D e l b r ü c k (39) beschreibt die Simultaninfektion einer Bakterienkultur mit Coli T₁ - und Coli T₂ - Phagen, wobei die Lyse erst nach der Latenzzeit für den Coli T₂-Phagen eintrat. Nach eingetretener Lyse ließen sich nur T₂-Phagenteilchen nachweisen.

5. Lysogenese.

Neben den virulenten Phagen, die sozusagen als Parasiten gelten können, werden Phagen beobachtet, die über Generationen in einer Vorstufe in Symbiose mit den Bakterien zusammen vorkommen. Derartige inaktive Phagen werden als Prophagen oder temperierte Phagen bezeichnet. Es handelt sich dabei um lysogene Bakterien, die bei ihrer Vermehrung mit der Erbmasse auch die Fähigkeit, Prophagen zu besitzen, weitergeben. Die DNS des Prophagen ist nach L w o f f (75) genartig an ein Bakterienchromosom gekoppelt und wird in dieser Form weiter vererbt. Die Prophagen können spontan oder durch Einwirkung von Strahlen und organischen Peroxyden infektionstüchtig werden. Man spricht dann von Lysogenese. Der Prophage greift die Trägerbakterien selbst nicht an. Nach B u r n e t (28) erweisen sich solche Bakterienstämme resistent gegen diese Phagen, die ihren Eigenschaften verwandt sind. Die Reaktion zwischen Bakteriophagen und Bakterien setzt nicht allein die Existenz spezifischer Rezeptoren voraus, sondern wird auch durch das mögliche Vorhandensein von Prophagen in entscheidender Weise beeinflusst.

E. Bakteriophagen in der bakteriologischen Diagnostik

Die exakte Bestimmung pathogener Erreger kann im Einzelfall mit großen Schwierigkeiten verbunden sein. Man ist daher bestrebt, Methoden aufzufinden, die in einfacher und schneller Weise die Erkennung dieser Keime ermöglichen. So hat die Verwendung der Bakteriophagen in der bakteriologischen Diagnostik - zur Bestimmung einer Bakterienart oder zur Typendifferenzierung innerhalb einer bestimmten Art - seit ihrer Entdeckung ständig an Bedeutung zugenommen. Beginnend mit der Art- bzw. Typendifferenzierung bei Typhus und Paratyphus ist diese diagnostische Methode zur Erkennung weiterer Keime, wie seltenen Salmonellen, Ruhr-, Coli-, Diphtheriebakterien und Mikro-

kokken, eingeführt worden.

Zuerst erkannte und studierte S o n n e n s c h e i n (114) im Jahre 1925 die Verwendungsmöglichkeit der Bakteriophagie in der bakteriologischen Diagnostik. Unter den wirksamen Bakteriophagen unterschied er schon solche, die stammspezifisch, also "autophag", sind, von anderen, die auf eine bestimmte Art von Bakterien, also "homoiophag", wirken. Es gelang ihm auch, aus mehrwertigen "Heterophagen" brauchbare, monovalente und streng art-spezifische Bakteriophagen zu isolieren. Seine Versuche dienten vor allem zur schnellen Erkennung der mikroskopisch und agglutinatorisch damals noch schwer oder gar nicht zu unterscheidenden Erreger der Typhus-, Ruhr- und Coligruppe. So hat er Bakteriophagen gewonnen, die spezifische Wirkung auf S.paratyphi B (Schottmüller) zeigten. Mit dieser Methode war es möglich, S.paratyphi B sicher von anderen Salmonellatypen abzugrenzen.

Diese Mitteilung S o n n e n s c h e i n s stand jedoch zu den Ansichten von d'H é r e l l e und anderen Autoren in Widerspruch.

D'H é r e l l e (42) vertrat die Anschauung, daß ein frisch aus dem Organismus gezüchteter Bakteriophagenstamm eine Anzahl verschiedener Bakterienarten nebeneinander angreife, und daß dessen Wirksamkeit sich z.B. auf die ganze Gruppe der Coli-Typhusbakterien erstrecken könne.

Auch M i e s s n e r und B a a r s (81) konnten die ursprünglich angenommene Spezifität der Bakteriophagen durch ihre Versuche nicht bestätigen.

O t t o und M u n t e r (86) betonen in einem ausführlichen Sammelreferat, daß dem d'H é r e l l e'schen Phänomen nicht die Spezifität zukommt, wie sie für die bakterielle Spezifität zutrifft.

Sehr eingehend beschäftigt sich S e i f f e r t (105) mit dem Spezifitätsproblem der Bakteriophagen. Dabei mußte er feststellen, daß selbst diejenigen Phagen, die zunächst stammspezifisch schienen, später auch gegen Bakterien aus ganz verschiedenen Familien lysogene Eigenschaften zeigten, vorausgesetzt, daß genügend Bakterienstämme getestet wurden. In seinen Versuchen berücksichtigt er vor allem die Variabilität der Bakterien, die die Wirkung der Bakteriophagen in großem Maße beeinflussen kann. So werden z.B. durch lysoresistente Keime lysosensible Bakterien völlig verdeckt. S e i f f e r t kommt bei seinen Untersuchungen zu dem Schluß, daß keine spezifisch wirkenden Ruhr- oder Typhusbakteriophagen existieren, gibt jedoch zu, daß eini-

ge Bakteriophagen bestimmte Bakterienarten bevorzugt angreifen.

Der S o n n e n s c h e i n 'schen Veröffentlichung von 1925 folgten jedoch andere, die die spezifische Wirkungsweise seiner Paratyphus B-Bakteriophagen bestätigen konnten.

So beschreibt M a r c u s e (77) schon im Jahre 1927, daß sich die epidemiologisch zusammengehörigen Stämme einer Bakterienart Bakteriophagen gegenüber gleich verhalten, ja sogar im Grade der Beeinflussung übereinstimmen.

S t a n d f u ß und L e h r (119) prüften die ihnen von S o n n e n s c h e i n zur Verfügung gestellten Paratyphus B-Bakteriophagen an zahlreichen Stämmen von S. paratyphi B, S. typhi-murium, S. enteritidis, S. abortivo-equina, S. cholerae-suis. Im Endergebnis ließen die untersuchten Phagen nur Aktivität gegenüber Schottmüllerstämmen erkennen. Somit bestätigten sie, daß mit Hilfe der Bakteriophagen eine ziemlich sichere Artbestimmung durchgeführt werden kann.

Nach einer 1929 von S o n n e n s c h e i n (115) veröffentlichten Arbeit ist vor allem der positive Ausfall der Bakteriophagenreaktion geeignet, die Typhusdiagnose zu beschleunigen. Ein negativer Ausfall der Bakteriophagenreaktion erlaubt es jedoch nicht, Typhus auszuschließen.

Dies bestätigen auch H o d e r und H e l l e r (65) durch ihre Untersuchungen. Die von ihnen verwendeten Bakteriophagen erwiesen sich nur bei 9 S. paratyphi B-Stämmen und einem S. typhi-Stamm wirksam. Alle übrigen Salmonellatypen wurden in keiner Weise beeinflußt. Sie machen in ihrer Arbeit auf die Möglichkeit aufmerksam, daß Keime bereits im Körper phagresistent werden können und sich dann auf der Platte dem Lysin gegenüber refraktär verhalten. Vor einer Einführung in die Praxis muß nach ihrer Meinung eine strenge Prüfung der entsprechenden Lysine an einer großen Anzahl von Stämmen durchgeführt werden, um die Verlässlichkeit ihrer Wirkung und die genaue Wirkungsbreite kennen zu lernen.

Die Verwertbarkeit der Typhusbakteriophagen für die Differenzierung von Typhusbakterien wird durch T e v e l i (122) hervorgehoben. T o y o d a (124) berichtet über die Verwendung von Bakteriophagen zur Bestimmung von Dysenteriebakterien. Er empfiehlt die Verwendung von Phagen in der bakteriologischen Diagnostik unter Berücksichtigung der Existenz von phagresistenten

Bakterienstämmen. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, daß mit Hilfe von Bakteriophagen schon in 12 bis 24 Stunden eine Typbestimmung möglich ist.

M a r c u s e (78) testet bei einer Nachprüfung der von S o n n e n s c h e i n angegebenen Bakteriophagendiagnostik mit den Typhus- und Paratyphus-Diagnostikphagen auch die Erreger der Gattung Shigella. Zunächst stellt er in Übereinstimmung mit S o n n e n s c h e i n und den anderen Nachuntersuchern eine weitgehende - nicht absolute - Artspezifität fest, und zwar bei den Typhus-Bakteriophagen in noch höherem Maße als bei den Paratyphus B-Bakteriophagen. Dementsprechend wurde kein einziger der Ruhrbakterienstämmen von den Typhus-Bakteriophagen angegriffen, wogegen der Paratyphus B-Bakteriophage weitgehende Wirkung auf fast sämtliche E-Ruhr- und Flexner-Stämme zeigte. Im Gegensatz dazu blieben die Flexner Y- und Shigakulturen unbeeinflusst. Somit gelang es, die E-Ruhr mit Hilfe des Paratyphus B-Bakteriophagen zu bestimmen.

Spezifisch eingestellte Diagnostikphagen gewinnt S c h m i d (100) durch Umzüchtung eines monovalenten Lysins. Er konnte so drei spezifisch gegen S.typhi-murium, gegen S.cholerae-suis bzw. gegen S.enteritidis und S.cholerae-suis eingestellte Phagen isolieren, die sich zur Identifizierung der genannten Bakterien eignen. Die Gewinnung spezifisch wirkender Phagen durch Umzüchtung gelingt, da Paratyphus B-Bakteriophagen latente Valenzen für alle Vertreter dieser Gruppe besitzen. Jede dieser Valenzen läßt sich durch entsprechende Methoden anzüchten und nach weiteren Passagen so festigen, daß ihr Wirkungsbereich nur auf eine Gruppe beschränkt bleibt. Durch Züchtung mit heterogenen Bakterienstämmen geht sogar die ursprüngliche Wirkung ganz verloren. In einer weiteren Arbeit bestätigt auch S c h m i d (101) die diagnostische Brauchbarkeit der S o n n e n s c h e i n'schen Typhus- und Paratyphus B-Bakteriophagen und weist auf die Verwendbarkeit seiner durch Umzüchtung gewonnenen Phagen zur Erkennung von S.typhi-murium-, S.enteritidis- u. S.cholerae-suis-Stämmen hin.

Auf Leuchtvibrionen wirksame Bakteriophagen beschreibt S o n n e n s c h e i n (116). Es handelt sich dabei um einen Cholerabakteriophagen, der durch Anpassungspassagen an Leuchtvibrionen adaptiert werden konnte. Die benutzte Anpassungsmethode beruht auf dem Prinzip, daß einem "phagischen System" aus Phage und passendem, lysosensiblen Bakterienstamm während des Ablaufs

der Phagwirkung der zu adaptierende Bakterienstamm beigegeben wird.

Während C l a u b e r g und M a r c u s e (31) der Bakteriophagendia-
gnostik bei der Ruhrtypendifferenzierung nur wenig Bedeutung beimessen, best-
tigen S a r t o r i u s und R e p l o h (97) ihre schon früher gemachte
Feststellung, daß bestimmte, aus Hühnerkot gewonnene und spezifisch hochge-
züchtete Phagen sehr wohl zur Typendifferenzierung der Ruhrbakterien heran-
gezogen werden können. Dies betonten S a r t o r i u s und R e p l o h
(98) nochmals in einer späteren Arbeit, worin sie gerade die Lysosensibilität
bestimmter Hühnerkotbakteriophagen gegenüber Ruhrbakterien als rassecharak-
teristisches, biologisches Merkmal bezeichnen.

Die Wirksamkeit des Originaldiagnostikphagen für S. paratyphi B nach S o n -
n e n s c h e i n ist von M a r c u s e (80) nochmals nachgeprüft worden. Er
kommt zu der Feststellung, daß dieser Phage innerhalb der Paratyphusgruppe
für S. paratyphi B (Schottmüller) weitgehend spezifisch ist. M a r c u s e be-
nützte zu seinen Versuchen frisch isolierte Stämme und alte Sammlungskultu-
ren. Die Wirkungsbreite des Originaldiagnostikphagen war jedoch für die Dia-
gnostik nicht ausreichend, da fast ein Drittel der echten Paratyphus B-Stämme
nicht erfaßt wurden. Nach durchgeführten Passagen mit Stämmen aus der pri-
mär nicht empfindlichen Gruppe konnte er jedoch Lysine erzeugen, die genü-
gend Wirkungsbreite besaßen, um diagnostisch verwendet werden zu können.

In einer weiteren Arbeit teilt M a r c u s e (79) die Typhusstämme sogar
nach ihrer Lysosensibilität ein. Er unterscheidet 1. von vornherein gegen den
Originalphagen empfindliche Stämme, 2. nur durch die Passagelysine zu er-
fassende Stämme, 3. völlig unempfindliche Stämme. Typhusstämme aus ver-
schiedenen Organen eines Patienten sind nach den Untersuchungen M a r c u s
Angehörige der gleichen Gruppe und gehören auch epidemiologisch zusammen.

Die Entdeckung des hitzestabilen Vi-Antigens durch F e l i x und P i t t
(52) im Jahre 1934 war die Grundlage für die Erforschung spezifisch wirkender
Bakteriophagen für diese Art. Schon 1936 beschrieben S e r t i c und
B o u l g a k o w (108) sowie unabhängig davon C r a i g i e (36) und
S c h o l t e n s (102) die Isolierung von Phagen, die nur in der Vi-Form
vorliegende Typhusbakterien in spezifischer Weise lysierten und deshalb für
die Diagnostik geeignet erschienen.

Eine Adaption des Vi-Phagen II auf verschiedenste Typhusstämme gelang
C r a i g i e und Y e n (37) im Jahre 1938. Es handelt sich dabei um Pha-

gen mit großer Spezifität für einen bestimmten Stamm. Diese Adaption wurde durch eine besondere Anpassungsfähigkeit des sog. Vi-Phagen II ermöglicht. Er zeigte hohe Aktivität für denjenigen Typhusstamm, auf dem er zuletzt gezüchtet wurde. Die Autoren differenzierten auf diese Weise zwanzig verschiedene Typhus-Vi-Typen und entdeckten später noch weitere 13 Typen. Sie maßen der Vi-Phagen-Typisierung als Hilfsmittel bei der Erforschung von Infektionsquellen deshalb große Bedeutung zu.

Die Typisierung von Paratyphus B-Stämmen gleichfalls mit Hilfe von Vi-Phagen gelang F e l i x und C a l l o w (50). Sie beschrieben zunächst 5 Typen, konnten aber schon im Jahre 1951 (F e l i x und C a l l o w (51)) die Anzahl der differenzierten Typen auf 10 erweitern.

E d l i n g e r (48) hebt in einer Arbeit die Wichtigkeit der mit Hilfe von Phagen gegebenen Differenzierungsmöglichkeit (Lysotypie) bei der Typhus- und Paratyphus B-Diagnose hervor. Er beschreibt weiter die Technik der bei der Lysotypie angewandten Methode und macht darauf aufmerksam, daß bereits in 24 Ländern die Lysotypie durchgeführt wird. Die Laboratorien der einzelnen Länder stehen in engster Verbindung mit dem "Central Enteric Reference Laboratory" in London, das die Typstämme und Typphagen verwaltet, neu gefundene Typen anerkennt und zweifelhafte Fälle nachprüft.

Auch R i s c h e, R o h n e und S c h n e i d e r (93) verwenden sich für diese Methode der Vi-Phagen-Typisierung von Salmonella typhi und Salmonella paratyphi B. Sie verweisen dabei auf die besondere Konstanz der Phagotypen. Der untersuchte Infektionsstamm wird - trotz Passagen durch verschiedenste, biologisch sehr unterschiedliche Wirtskörper - von den Phagen in so ähnlicher Weise gelöst, daß oft auch in Einzelheiten, z.B. den Lysisgraden, noch eine Übereinstimmung vorhanden ist.

Die Lysotypie ermöglicht eine wesentlich feinere Aufgliederung der Stämme als andere Methoden und ist deshalb geeignet, die bisherigen Untersuchungsverfahren bei der Typhusdiagnose zu erweitern und die epidemiologischen Zusammenhänge dieser Erkrankung aufzuklären. F r e y t a g und P l o c h m a n n (53) stellen die Forderung auf, daß es, um international vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, nötig ist, einheitliche Testphagen zu verwenden. Ferner ergibt sich die Notwendigkeit, bei der Durchführung der Untersuchungsgänge sowie beim Ablesen der Befunde ein einheitliches Schema zugrunde zu legen.

Durch Zusammenarbeit der verschiedenen Institute war es möglich, in der ganzen Welt die Verbreitung der verschiedenen Phagtypen bei Typhus- und Paratyphus B-Epidemien zu studieren. Während einzelne Typhustypen selten auftreten, ist in Deutschland der Phagtyp E₁ besonders häufig beobachtet worden. Der hohe Anteil des Phagtyps E₁ bei den vorkommenden Typhusinfektionen veranlaßte B r a n d i s (19), den genannten Typ in Subtypen zu unterteilen. Er konnte mit einem Vi-Phagen zwei Subtypen von E₁, die beide sehr stabil waren, differenzieren.

B r a n d i s (20) berichtet weiter, daß die Lysotypie auch beim Testen der epidemiologisch wichtigen Dauerausscheider benützt werden kann. Um eine von bekannten Dauerausscheidern ausgehende Ansteckung gleich zu erkennen, wird von einigen Autoren die Registrierung des jeweiligen Bakterientyps gefordert.

Eine weitere Arbeit von B r a n d i s (21) gibt einen Überblick über die vom Hygiene-Institut der Universität Frankfurt in den Jahren 1950 bis 1954 typisierten Paratyphus B-Stämme. Er streift kurz die nach einheitlichen Richtlinien bei der Lysotypie angewandten Methoden und gibt die in Deutschland vorkommenden Typen und die prozentuale Häufigkeit ihres Vorkommens bekannt. Beim Vergleich der Typenhäufigkeit des Typhus in den einzelnen Jahren zeigten sich keine großen Verschiebungen. Die gefundene Typenverteilung macht deutlich, daß in den europäischen Ländern die Typenzusammensetzung nur gering variiert. Demgegenüber ergibt sich für Ostasien eine ganz andere Typenverteilung. So werden dort z.B. Typhustypen an erster Stelle gefunden, die in Europa überhaupt nicht vorkommen. Bei den Paratyphus B-Bakterien können mit Hilfe von Phagen 10 Typen unterschieden werden, die 3 serologisch verschiedenen Gruppen zugehören. Zu beachten ist auch, daß einige andere Salmonellen von den Paratyphus B-Phagen angegriffen werden, was bei der Anwendung der Lysotypie für epidemiologische Zwecke jedoch von geringer Bedeutung ist. Auch beim Paratyphus B (Schottmüller) können einige Phagtypen in Subtypen weiter unterteilt werden.

Aus der Stuhlprobe einer Dauerausscheiderin züchtete B r a n d i s (17) einen Paratyphus B-Stamm, der bei der Phagtypisierung von Paratyphus B-Phagen nicht gelöst, von Salmonella O-Phagen jedoch angegriffen wurde. Der zu diesem Zeitpunkt noch nicht bestimmbare Bakterienstamm konnte erst nach

2 Jahren mit neu gefundenen Phagen in später entnommenen Stuhlproben typisiert werden. Bei der Prüfung mehrerer, von Einzelkolonien ausgehender Subkulturen zeigte sich eine merkwürdige Aufspaltung. Die Ursache für das atypische Verhalten war die Existenz eines Prophagen, der aus einer Subkultur isoliert werden konnte. In den übrigen, sich normal verhaltenden Subkulturen konnte kein Prophage nachgewiesen werden. Das verschiedenartige Verhalten der einzelnen Subkulturen gegenüber den Paratyphus B-Typenphagen ist demnach vom Vorhandensein oder Fehlen eines Prophagen abhängig.

In einer späteren Arbeit berichtet B r a n d i s (18) noch über seine weiteren Versuche mit dem isolierten Prophagen. Er stellte dabei eine große Spezifität für *Salmonella paratyphi* B fest. Selbst die unverdünnte Phagpräparation löste *S. typhi*-murium und *S. typhi* nicht. *S. abortus* equina, *S. schwarzengrund* und *S. chester* wurden jedoch vom unverdünnten Phagfiltrat angegriffen. B r a n d i s weist nochmals darauf hin, daß der jeweilige Zustand der Bakterienzelle, der durch latente oder exogene Phagen beeinflusst wird, eine wichtige Rolle bei der Phagenempfindlichkeit spielt.

B r a n d i s und T h o m s e n (23) prüften Java-Stämme mit Paratyphus B-Typenphagen. Ein Teil der Java-Stämme wurde durch Typenphagen nicht, wohl aber durch *Salmonella* O-Phagen angegriffen. Sie sind also nicht bestimmbar. Der andere Teil der Stämme gibt bei der Lysotypie Bilder, die denen der Paratyphus B-Typen entsprechen.

Mit Hilfe der Phagendiagnostik ermittelte S i e v e r s (113) einen neuen Salmonellatyp. Es handelte sich um einen aus einer Kotprobe gezüchteten Stamm, der sich nach seinen Kulturmerkmalen und nach seiner Prüfung mit verschiedenen O- und H-Seren als *S. typhi*-murium erwies. Beim Testen mit einem spezifischen Paratyphus B-Phagen, der sonstiges *S. typhi*-murium-Bakterien nicht löste, zeigte der isolierte Stamm jedoch Lysis.

Zur Erkennung atypischer *Brucella*-Kulturen benützte D r o z e v i n a (47) einen polyvalenten Phagen. Der gefundene Bakteriophage griff in 88 - 98 % die *Brucella*kulturen an und zeigte sich bei der Überprüfung von 174 verschiedenen Bakterien ausgesprochen spezifisch.

P ö h n (90) beschreibt die Lysotypie bei *Micrococcus aureus*, die mit 39 verschiedenen Phagstämmen durchgeführt wurde. Ein Teil der Phagstämmen konnte aus lysogenen Mikrokokkenstämmen gewonnen werden. Andererseits

eröffnete die Adaption von Phagen an Mikrokokkenstämme weitere Typisierungsmöglichkeiten. Als Ausgangsbasis dienten hier nicht nur ein einziger anpassungsfähiger Phage, sondern mehrere Phagenstämme, die bei der Typisierung leicht zu übergreifenden Reaktionen führten. Bei der Staphylokokken differenzierung ist die Angabe eines exakten Typs daher nicht möglich. Es werden alle Phagen aufgezeichnet, die mit dem zu testenden Stamm eine starke Reaktion ergeben. Dieses Phänomen wird auch als Phagbild bezeichnet. Auf diese Weise entstehende Phagbilder werden in 4 Gruppen (I - IV) eingeteilt. Dabei entsprechen die Gruppen I - III auch den serologischen Gruppen. Einige Reaktionsbilder lassen sich zwar nicht in die genannten Gruppen einteilen, aber durch Vergleich mehrerer Reaktionsbilder kann doch die Identität von Staphylokokkenstämmen festgestellt werden. Die benützten Phagstämme werden zur Feststellung des "Lyse-Spektrums" an 22 verschiedenen Standardstämmen getestet. Die Bedeutung der Lysotypie bei den Staphylokokken liegt ebenfalls auf dem Gebiete der Aufklärung von Infektionsquellen. Von besonderem Wert kann die Phagtypisierung für die epidemiologischen Ermittlungen bei Lebensmittelvergiftungen sein, die mit pathogenen Mikrokokken in kausalem Zusammenhang stehen.

Die Gewinnung von Lysaten, die gegenüber Streptokokken wirksam sind, gelang S e r t i c (107). Er konnte mit seinen Phagfiltraten Drusestreptokokken von nicht hämolytischen Streptokokken unterscheiden.

Eine Trennung von Rotlaufbakterien mit Hilfe von Phagen in Rotlauf A- und Rotlauf B-Stämme versuchte H a m m e r (61). Es gelang ihm, aus Tonsillen des Schweines und Material aus dem Bereich der Ileocaecalklappe beim Schwein 6 spezifisch wirkende Rotlaufphagen zu isolieren. Die 3 Phagpräparationen, die in Kulturen von Rotlauf A-Stämmen gewachsen waren, lösten auch den A- auch B-Stämme. Demgegenüber zeigten sich an B-Stämme adaptierte Phagen anfänglich nur gegenüber Rotlauf B-Stämmen aktiv. Nach mehreren Passagen an A-Stämmen lösten jedoch die B-Phagpräparationen später auch A-Stämme.

Aus Abwasser isolierten B r a n d i s und S c h w a r z r o c k (22) insgesamt 7 Proteusphagen und prüften ihr Verhalten gegenüber Proteus-Teststämmen. 6 von den gefundenen Proteusphagen unterschieden sich durch Lokalisationsform bzw. -größe im Bakterienrasen und durch verschiedene Thermoresistenzen. Die Autoren halten daher eine Phagtypisierung von Proteusbakterien für möglich.

lich. Da sich eine übergreifende Phagwirkung auf andere Bakterienarten nicht feststellen ließ, muß mit einer besonderen Spezifität gegenüber *Proteus*-stämmen gerechnet werden.

Für die Coliphagen stellte bereits B a i l (5) eine ausgesprochene stamm-spezifische Wirkung fest; er sieht deshalb in der umfassenden Anwendung von Bakteriophagen ein neues, geeignetes Trennungs- und Erkennungsmittel bei der Coli-Diagnosestellung.

G r a t i a (57) konnte dementsprechend in einer Colikultur 2 Stämme mittels Phagen voneinander trennen. Sein R-Stamm zeigte sich empfindlich gegenüber den "kleine Lochkolonien" bildenden Phagen, während sein S-Stamm nur z. T. gegenüber den "große Lochkolonien" bildenden oder gegenüber beiden Phagen empfindlich war.

Zur selben Zeit wie G r a t i a versuchte B u r n e t (29) eine Einteilung der Coli-Bakteriophagen in 12 verschiedene serologische Typen. In eine serologische Gruppe stellte er jeweils Phagen, die gleichartige Phagflecken zeigten, eine bestimmte Wirkungsbreite hatten, und unter deren Einfluß einander ähnliche, phagfeste Bakterienkolonien entstanden. Die zu einer Gruppe zusammengefaßten Phagen zeigten auch nur geringe antigene Unterschiede.

Heute sind gerade die Coliphagen eingehend erforscht. Vor allem sind die Phagen der T-Serie genauestens definiert. Ihr Wirtsbakterium ist *Escherichia coli* B. Es werden 7 Phagen der T-Serie unterschieden. Durch serologische Kreuzreaktionen war es möglich, die 7 T-Phagen in folgende 4 Gruppen einzuteilen: T_1 ; T_3 , T_7 ; T_5 und T_2 , T_4 , T_6 . Phagen aus verschiedenen Gruppen geben keine Kreuzreaktion, sondern nur Phagen ein und derselben Gruppe. Gruppenidentische Phagen gleichen sich auch in ihrem morphologischen Aufbau. Gerade mit Hilfe der genau definierten Phagen der T-Serie war es W e i d e l (131, 133, 134, 135) und anderen Autoren möglich, die für die Phagreaktion verantwortlichen Strukturen der Zellmembran von *Escherichia coli* B näher aufzuklären. Damit konnten die Phag-Wirt-Wechselbeziehungen näher beleuchtet werden.

Unter den durch Bakteriophagen beeinflussbaren Bakterienarten nennt d' H é r e l l e (42) auch den "*Bacillus gallinarum* Klein" und den "*Bacillus paragallinarum*". Er beobachtete, daß der gegen *Bacterium gallina-*

rum wirksame Bakteriophage nicht immer gegen alle Paragallinarumarten gerichtet ist. Die Stämme von *Bacterium gallinarum* verhielten sich Bakteriophagen gegenüber sehr einheitlich. Man findet den Gallinarumbakteriophagen beständig im Darm von Hühnern, die der Infektion Widerstand leisten, D'Hérelle konnte auch aus dem Blut von 3 kranken Hühnern, die die Krankheit überstanden hatten, spezifische Phagen züchten. Im Darm gesunder Tiere, die in seuchenfreier Umgebung leben, konnte er Gallinarumphagen nicht isolieren.

Weiterhin beschreibt d'Hérelle (42) den Einfluß des Bakteriophagen auf den Verlauf der Krankheit (Vogeltyphose). Er berichtet über den Krankheitsverlauf und den jeweiligen Bakteriophagenbefund bei 4 Fällen, die in Heilung ausgingen. Bei 4 genesenen Hühnern war der Bakteriophage im Darm lange Zeit nachweisbar und gegen *S.gallinarum* virulent. Bei Untersuchung der Ausscheidungen von 100 an Vogeltyphose verstorbenen Hühnern konnte er keinen gegen *S.gallinarum* oder *Bacterium paragallinarum* wirksamen Phagen finden. Auch bei den verendeten Tieren waren Phagen nach der Sektion im Darm nachzuweisen, die durch ihre Wirksamkeit gegen einen oder mehrere Stämme der Typhus-, Ruhr- oder Coligruppe bestimmt werden konnten. Der letale Ausgang wird damit begründet, daß diese Phagen gegen den kausalen Keim keine Virulenz erlangten.

D'Hérelle studierte an der Vogeltyphose nicht nur den Einfluß der Bakteriophagen auf die Krankheit des Einzelindividuum, sondern auch auf den ganzen Seuchenverlauf. In nicht verseuchten Gebieten hat er im Verlauf von 3 Jahren 81 mal Kot von Hühnern untersucht. In diesen Proben hat er wohl Phagen gegen Vertreter der Typhus-, Ruhr- und Coligruppe nachweisen können, aber niemals Phagen gegen *S.gallinarum*. In verseuchten Gegenden konnte er dagegen Phagen isolieren, die gegenüber *S.gallinarum* Virulenz zeigten. Weiter beschreibt d'Hérelle auch Immunisierungsversuche mit Bakteriophagen bei Vogeltyphose. Er weist dabei auf die Schwierigkeiten hin, die sich aus der unterschiedlichen Virulenz der Phagen gegen die einzelnen Arten von *S.gallinarum* ergeben. Trotzdem ist es ihm gelungen, 95 % pullo-ruminfizierte Hühner mit Bakteriophagen zu heilen.

Burnet (25) versuchte als erster, den Erreger der weißen Kükenruhr mit Hilfe von Phagen zu unterteilen. Er testete mit einer ganzen Phagserie zahlreiche Stämme von *S. gallinarum* und konnte so 2 Gruppen mit verschiedener

Empfindlichkeit voneinander trennen.

Aus dem Darminhalt von 100 verendeten Hühnern sowie aus dem Kot von 6 Papageien konnte T h u m e s (123) 10 bakteriolytisch wirkende Filtrate gewinnen. In 7 Fällen erwiesen sich diese Filtrate nur gegen *S. pullorum*, in einem Fall nur gegen *S. gallinarum* und in 2 Fällen ausschließlich gegen *S. typhi-murium* aktiv. Nach Passagen lösten die ursprünglich nur gegen *S. pullorum* aktiven Phagen später, allerdings in schwächerem Maße, auch *S. gallinarum*-Bakterien. 2 Bakteriophagen jedoch verhielten sich nach wie vor typenspezifisch für *S. pullorum* und konnten so zur Differenzierung der damals als *S. pullorum* und *S. gallinarum* noch unterschiedenen Erreger herangezogen werden.

Um die Aktivität der spezifisch wirkenden Bakteriophagen bestimmen zu können, prüften F u r s e n k o, D m i t r i e f f und S c h o s t a k (55) *S. gallinarum*- bzw. *S. pullorum*-Phagen an einer Vielzahl von Stämmen. Sie konnten feststellen, daß verschiedene Stämme von einem "starken" Filtrat ungleich lysiert wurden. In keinem Fall erfolgte vollkommene Lysis, und stets erschienen später resistente Kolonien. Von 24 getesteten Stämmen erwiesen sich 3 als absolut resistent. Die phagesistenten Bakterienstämme besaßen jedoch volle Virulenz. Die den Küken eingespritzten, spezifisch wirkenden Phagen zeigten weder heilende noch vorbeugende Wirkung.

S p a l a t i n (117) prüfte an 10 lysinfreien *S. gallinarum*- und 5 Coli-stämmen die von ihm aus Hühnerkot gewonnenen Phagfiltrate. Es gelang ihm, bei 10 pullorumnegativen Hühnern auf die Dauer eines Monats täglich Phagen gegen die genannten Bakterien festzustellen. Bei 10 mit Geflügeltyphus infizierten Tieren, deren Serumtiter zwischen 1 : 20 bis 1 : 1000 lag, war der Gehalt an virulenten Phagen identisch. Die Prüfung von Eiern auf Phagengehalt verlief sowohl bei klinisch gesunden Hühnern als auch bei serologisch positiven Tieren negativ. Ebenso konnte er bei seinen Versuchen mit bebrüteten Hühnereiern keine Phagen nachweisen. In Kotabscheidungen von normal aufgezogenen Küken fand er jedoch schon bei 2 bzw. 3 Tage alten Tieren Phagen gegen die betreffenden Bakterien. Um die Herkunft der Phagen näher zu beleuchten, untersuchte S p a l a t i n bei 26 Hühnern den Phagengehalt verschiedener Darmabschnitte. Die gleichmäßige Besiedlung des Hühnerdarms mit Phagen spricht nach Meinung S p a l a t i n s für eine alimentäre Aufnahme von Phagen.

Mit Hilfe der Ultrafiltration bestimmte S p a l a t i n (118) für Pullorum-

phagen eine Größenordnung zwischen 17 und 25 m μ .

B e g a n o v i ć (8) stellte in seinen Versuchen fest, daß der von ihm verwendete Phagstamm in vitro alle 90 geprüften *S. pullorum*-Stämme löst. In vivo zeigte er jedoch nicht die gleiche Wirkung. Die schlechte Wirkung in vivo führte er auf die Bildung von phagresistenten Bakterien, die pathogen geblieben sind, zurück.

In einer weiteren Arbeit versuchten B e g a n o v i ć und T o p o l n i k (9), mit Hilfe von Bakteriophagen die Erreger der Kükenruhr zu diagnostizieren bzw. *S. pullorum*- und *S. gallinarum*-Stämme voneinander zu trennen. Es ist den Autoren gelungen, mit 2 für *S. gallinarum* spezifischen Bakteriophagen *Salmonella gallinarum* und *Salmonella pullorum* zu unterscheiden. In der kritischen Verdünnung 10^{-5} wurden alle *S. gallinarum*-Stämme mit Ausnahme eines R-Stammes sehr stark gelöst, während dies bei keinem *S. pullorum*-Stamm der Fall war.

III. Eigene Versuche.

a). Untersuchungsmaterial und -methoden.

A. Die Kultur.

Als Testbasis für Phagversuche dienten 22 Stämme von *Salmonella gallinarum*, die im Tierhygienischen Institut Freiburg aus Untersuchungsmaterial frisch isoliert werden konnten. Weitere 8 Stämme verdanke ich dem freundlichen Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. R o o t s, Giessen. Somit standen für die Untersuchungen insgesamt 30 *S.gallinarum*-Stämme zur Verfügung. *S. gallinarum* ist als einziger geisselloser Typ innerhalb der Salmonellagruppe durch die Antigenformel 9, 12 präzisiert. Die Beschaffenheit der somatischen Partialantigene erlaubt es, die verwendeten *S.gallinarum*-Stämme in 2 Gruppen zu unterteilen.

1. Vollantigene Stämme = Stämme, die das Partialantigen 12₂ besitzen.
(Sie werden in der Arbeit kurz als 12₂++ bezeichnet.)

2. Minusvarianten = Stämme, die das Partialantigen nicht oder nur sehr gering besitzen. (Sie werden in der Arbeit kurz als 12₂+ bezeichnet.)

1. Aus der Gruppe der vollantigenen Stämme fanden insgesamt 22 *S.gallinarum*-Stämme Verwendung, die nachstehend aufgeführt werden.

a) Aus Untersuchungsmaterial frisch isolierte Stämme:

Stamm A	Stamm V
Stamm B	Stamm W
Stamm H	Stamm X
Stamm K	Stamm Y
Stamm Q	Stamm Z
Stamm R	Stamm A ₁
Stamm U	Stamm B ₁

b) Lyophilisierte Stämme:

Stamm P₂

Stamm P₅

Stamm P₇

Stamm P₈

Stamm P₉

c) Ältere Laboratoriumsstämme:

Stamm D = 2868

Stamm F = IV/4

Stamm G = IV/6

2. Die Gruppe der Minusvarianten war mit 8 Stämmen vertreten:

a) Aus Untersuchungsmaterial frisch isolierte Stämme:

Stamm C

Stamm S

b) Lyophilisierter Stamm:

Stamm P₁

c) Ältere Laboratoriumsstämme:

Stamm E = 244

Stamm M = 1/0

Stamm N = 117/55

Stamm O = 6/0

Stamm P = 11/0

Die Aufstellung läßt erkennen, daß die Mehrzahl frisch isolierter Stämme der Vollantigengruppe zuzuordnen sind (Vorhandensein des Partialantigens 12₂). Demgegenüber erwiesen sich nur 2 frische Stämme als Minusvarianten.

Jeder Versuch einer Typisierung von Bakterien durch Phagen bedingt einwandfreie Reinkulturen. Weiterhin ist das Arbeiten mit serologisch definierten S-Formtypen unbedingtes Erfordernis. Die verwendeten *S.gallinarum*-Stämme wurden deshalb auf Reinheit sowie serologisch laufend überprüft.

Zur Ermittlung einer evtl. Phagspezifität gegenüber *S. gallinarum* (pullorum) wird das Verhalten isolierter Phagen weiterhin an zahlreichen Stämmen verschiedener Bakteriengattungen getestet. Es handelt sich dabei um:

Salmonella typhi-murium
Salmonella cholerae-suis
Salmonella typhi
Salmonella enteritidis
Salmonella anatum
Shigella sonnei (E-Ruhr)
Shigella paradysenteriae (Flexner-Ruhr)
Micrococcus pyogenes var. albus
Corynebacterium pyogenes
Corynebacterium diphtheriae, Typus intermedius
Erysipelothrix rhusiopathiae.

B. Unterhalt der *S. gallinarum*-Kulturen.

Die Konservierung der *S. gallinarum*-Kulturen erfolgt auf Nährmedien in großen Petrischalen als sog. Stockkultur. Die Größe der Petrischalen vermeidet häufiges Überimpfen und sichert weitgehend ein genetisch einheitliches Material.

Die Zusammensetzung des Nährmediums ist folgende:

Agar	2 %
Tryptopepton Merck	1 %
Liebig Fleischextrakt	1 %
NaCl	0,3 %
Na ₂ HPO ₄	0,2 %
Pferdeserum	10 %
H ₂ O	ad 100 ml.

Auf diesem Nährmedium werden *S. gallinarum*-Kulturen bei 37° C nur solange inkubiert, bis deutliches Wachstum eingetreten ist. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank. Der Serumzusatz verfolgt den Zweck, einen Übergang der Kulturen von S- in R-Form tunlichst zu vermeiden. Jeder Formenwechsel zeichnet sich nicht allein morphologisch ab, sondern ist im allgemeinen von einer tiefgreifenden Veränderung in der Struktur der O-Antigene begleitet. Die damit verbundene Verschiebung in der Phagempfindlichkeit würde beim Testen

von Phagen auf derartigen Kulturen störend wirken.

C. Nährböden für die Phagbestimmung.

Der einwandfreie Ablauf der Phagreaktion wird von der Wahl des Nährbodens in entscheidender Weise bestimmt.

1. Flüssige Nährmedien:

In einzelnen Versuchsreihen findet eine Nährbouillon mit pH 8,0 und folgender Zusammensetzung Verwendung:

Fleischwasser	1000	ml
Pepton	11	g
Kochsalz	3	g
Dikaliumphosphat (n. Sörensen)	2	g

2. Feste Nährmedien:

Während früher ungefärbte Nährböden Verwendung fanden, wird seit der Entdeckung der Farbindikatorplatte durch B r e s c h (24) diese in der Phagdiagnostik bevorzugt angewandt. Als Testbasis für *S. gallinarum*-Phagen erwies sich eine modifizierte Wasserblau-Dextrose-Agarplatte nach R a e t t i g (92) als besonders geeignet.

Die Zusammensetzung der verwendeten Wasserblau-Dextrose-Agarplatte ist folgende:

Agar (2 %ig) pH 8,0	100	ml
Dextrose	1,2	g
Tryptophan-Stammlösung	8,5	ml
2 %ige wässrige Wasserblaulösung	0,86	ml

Die Herstellung der Wasserblau-Dextrose-Agarplatte ist denkbar einfach:

100 ml gewöhnlicher Agar, mit 10%iger Natronlauge auf pH 8,0 eingestellt, werden mit 1,2 g Dextrose durch Kochen verflüssigt. Danach werden zunächst 8,5 ml Tryptophanstammlösung und erst nach erfolgter Abkühlung auf Handwärme noch 0,86 ml einer 2%igen wässrigen Wasserblaulösung zugegeben. Nach gründlichem Mischen erfolgt sofort das Giessen der Platten in üblicher Weise. Nach dem Erstarren werden die Platten offen bei 37° C während

2 1/2 Stunden im Brutschrank getrocknet. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß Wasserblau in wässriger Lösung mehrere Tage vor der Verwendung mit destilliertem Wasser angesetzt und vor dem Vermischen mit dem Agar filtriert werden muß.

Die Zusammensetzung des Nährmediums wird weiter durch die Entdeckung A n d e r s o n s (1) bestimmt, daß Tryptophan die Adsorption zwischen Phagen und Bakterien begünstigen kann. Alle verwendeten Nährböden erhalten deshalb einen Zusatz von Tryptophan in geringer Konzentration.

Um ein exaktes Arbeiten zu ermöglichen, wird eine Tryptophan-Stammlösung hergestellt, die in definierten Mengen dem Nährmedium jeweils zugesetzt werden kann.

Tryptophan-Stammlösung:

Die Ausgangsbasis bildet Tryptophan in Reinsubstanz mit einem Molekulargewicht von 204, 222 g. Die Verwendung des in Bouillon gelösten Tryptophans erfolgt in einer Verdünnung von 10^{-2} .

Herstellung der Tryptophan-Stammlösung:

Um die gewünschte Verdünnung von 10^{-2} zu erhalten, müssen 0,204 g Tryptophan in 99, 796 ml Flüssigkeit gelöst werden. 0,204 g Tryptophan werden in einem Erlenmeyerkolben mit 20 ml Bouillon (pH 8,0) gelöst. Um eine gleichmäßige Verteilung des Tryptophans in der Flüssigkeit zu erhalten, muß der Kolben unter ständigem Schütteln über der Flamme etwa 20 Minuten erhitzt werden. Man kann unbesorgt erhitzen, da das Tryptophan bis zu einer Temperatur von 280°C nicht denaturiert wird. Erst nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur füllt man mit steriler Bouillon auf 100 ml auf und durchmischt nochmals den gesamten Inhalt. Die Lösung wird nach ihrem völligen Erkalten im Eisschrank aufbewahrt.

D. Vorkommen von Bakteriophagen.

Bakteriophagen finden sich am häufigsten in Ausscheidungen bzw. Darminhalt

von Tier und Mensch. Außerdem wurden sie in der Erde, in Abwässern, Flüssen und Meeren nachgewiesen, was sicher auch auf die oben genannten Quellen zurückgeführt werden kann. Man spricht heute sogar von einem ubiquitären Phagenvorkommen. Angesichts dieser Tatsache ergeben sich für eine Phageninfektion der Lebewesen verschiedene Deutungsmöglichkeiten. Jeder geregelte Lebenszyklus von Phagen erfordert von Zeit zu Zeit auch die Gegenwart von Bakterien, da die Existenz der Phagen vom Vorhandensein homologer Bakterien abhängig ist. Der Phage kann multivalent, aber auch sehr spezifisch sein.

E. Gewinnung von Phagen.

Zur Gewinnung von Phagen werden einige Gramm des Ausgangsmaterials im Erlenmeyerkölbchen mit 25 ml Tryptophanbouillon (pH 8,0) aufgeschwemmt und gut geschüttelt. Daraufhin werden der Suspension einige Tropfen einer 24 Stunden alten *S.gallinarum*-Kultur zugesetzt, und das Ganze für 24 - 48 Stunden bei 37° C inkubiert. Durch die Zugabe homologer Organismen soll eine Anreicherung im Ausgangsmaterial vorhandener, spezifischer Phagen erreicht werden.

Um gröbere Bestandteile zu entfernen, läßt man die Suspension im Anschluß an die Bebrütung zweimal ein gewöhnliches Faltenfilter passieren. Hieran anschließend wird das Filtrat durch sterile Seitzfilter filtriert. Das Klarfiltrat fängt man in sterilen Reagenzröhrchen auf. Jedes Röhrchen wird zur Kennzeichnung mit einer bestimmten Nummer versehen. Das gewonnene Seitzfiltrat ist dann auf Keimfreiheit zu prüfen. Mit abgeflammter Öse wird jedem Röhrchen Material entnommen und auf Blutplatte ausgestrichen. Nach 24stündiger Inkubation bei 37° C überprüft man die beimpften Platten auf Keimfreiheit.

F. Phagbestimmung.

Die Prüfung keimfreier Filtrate auf Phaggehalt erfolgt im wesentlichen auf festen Nährböden. Hier findet die Wasserblau-Dextrose-Agarplatte nach R a e t t i g (92) Verwendung. Selbst schwach wirksame Phagen können hierauf noch nachgewiesen werden. Aber auch flüssige Nährböden in Form gewöhnlicher Bouillon werden neben der Wasserblau-Dextrose-Agarplatte

benützt.

a) Bouillontestverfahren.

Jeweils 8,5 ml der Nährbouillon werden in sterilen Reagenzröhrchen abgefüllt und zur Sicherstellung der Sterilität für 2 Stunden autoklaviert.

Die erkalteten Röhrchen beimpft man mit einer 24 Stunden alten *S.gallinarum*-Kultur. 0,5 ml des zu prüfenden, klarfiltrierten Materials und 1,0 ml der Tryptophan-Stammlösung werden zugegeben. Um bakterielle Verunreinigung zu vermeiden, werden die Röhrchen nach jedem Öffnen gut abgeflammt. Die einzelnen Röhrchen enthalten nun 10 ml Inhalt und werden anschließend für 16 Stunden bei 37°C bebrütet.

b) Plattentestverfahren.

Zum Phagennachweis bedient man sich des Auftropfverfahrens. Aus Gründen der Materialersparnis werden die Platten vor der Beimpfung mit Fettstift in 8 gleichgroße Felder aufgeteilt. Innerhalb dieser Sektoren müssen die Filtratimpfstellen durch Ringe markiert werden. Auf diese Weise lassen sich auf dem zur Verfügung stehenden Raum relativ viele Filtrate testen. Dann werden einige Kolonien einer 24 Stunden alten Bakterienkultur mit abgeflammerter Platinoöse auf der Oberfläche einer Wasserblauplatte ausgestrichen. Mit einem Drigalskispatel verteilt man hierauf das Kulturmaterial gleichmäßig über die gesamte Oberfläche des Nährmediums. Nach der Beimpfung läßt man die Platten bei Zimmertemperatur gut trocknen. Die Filtrate werden mit sterilen Ösen bzw. Pipetten im Bereich der Markierung aufgetragen. Um Verunreinigung der Filtrate zu vermeiden, werden die Röhrchen vor und nach der Filtratentnahme abgeflammt. Die Platten stellt man nun 16 - 24 Stunden bei 37°C in den Brutschrank. Nach Abschluß der Inkubation erfolgt die Prüfung auf gelöste Zonen.

G. Phagwirkung.

Die Wirkung der Phagen zeigt sich auf der Wasserblau-Dextrose-Agarplatte durch mehr oder weniger große, mit Farbveränderungen einhergehende Ausparung gegenüber dem sonst homogenen Bakterienrasen.

Die Beurteilung gelöster Zonen wird nach folgendem Schlüssel vorgenommen:

1. +++ = t.L. = totale Lysis - die gelöste Zone ist von der Größe der originalen Filtratbeimpfung = konfluente Lysis.
2. ++/
+++ = p.L. = partielle Lysis - die Größe der gelösten Zone entspricht der originalen Filtratbeimpfung, doch verbleibt ein Reticulum ungelöster Kolonie = semikonfluente Lysis.
3. ++ = mehrere einzelne Zirkel, auch "plaques" oder "taches vierges" genannt.
4. + = ein Zirkel.
5. - = k.L. = keine Lysis.

Bei 3. und 4. können große (g. Z.) und kleine (k. Z.) Zirkel auftreten.

Im Bouillontestverfahren wird die Phagwirkung im Gegensatz zu den Kontrollkulturen durch Klärung angezeigt.

H. Phagvermehrung.

Die Lysis sowie die Vermehrung der Phagen erfolgt nur bei Anwesenheit lebender Bakterien in der Vermehrungsphase. Doerr und Grüninger (45) konnten zeigen, daß die Vermehrung der Phagen bei konstanter Temperatur und konstanter Wasserstoffionenkonzentration dem Wachstum der Bakterien parallel verläuft. Jeder Phage vermehrt sich durch Passage in lebenden Bakterien bis zu einem für jede Phagenart konstanten Höchsttiter. Durch Phagenverdünnung in Zehnerpotenzen ist es möglich, die kritische Konzentration (= CTC) jedes Phagfiltrates festzustellen. Diese kann Aufschluß über die Aktivität der betreffenden Phagsuspension erteilen.

Während viele Phagen bei ihrer Isolierung nur wenig aktiv sind, ist es möglich ihre Aktivität schon nach einigen Passagen an homologen Bakterien um ein Beträchtliches zu steigern.

a) Vermehrung der Phagen in Bouillon.

Ein Röhrchen mit 5,0 ml Traubenzuckerbouillon (pH 8,0) wird mit einer 24 Stunden alter Pullorumkultur beimpft und nach Zugabe von etwa 0,5 ml des zu vermehrenden Phagfiltrats und 0,5 ml der Tryptophan-Stammlösung

bei 37°C 16 - 24 Stunden lang bebrütet. Darauf erfolgt Filtration durch einen Seitzfilter. Das gewonnene Filtrat kann getestet bzw. durch erneute Passage mit einer jungen Bakterienkultur weiterhin angereichert werden.

b) Zirkelvermehrung der Phagen.

Eine Wasserblau-Dextrose-Agarplatte wird mit einer 24 Stunden alten Bakterienkultur zur Hälfte ausgespatelt und die Beimpfungsgrenze durch einen Querstrich markiert. Im vertikalen Verlauf zur Beimpfungsgrenze wird gleichzeitig der Filtratverlauf gekennzeichnet. Nach gutem Trocknen der Platten läßt man das mit der Pipette entnommene Phagfiltrat entsprechend der Markierung als Tropfenspur über die Platte laufen. Dann wird bei Zimmertemperatur getrocknet und anschließend bei 37°C auf die Dauer von 16 - 24 Stunden bebrütet.

Nach der Bebrütung werden gelöste Zonen oder einzelne Plaques mit einer sterilen Platinöse ausgestochen und in ein Reagenzgläschen mit 1,8 ml Bouillon übertragen. Um überlebende Bakterien zu töten, wird das Röhrchen für 40 Minuten in einem Wasserbad von 60°C gehalten. Nach Abkühlung gibt man 0,2 ml Äther zu, schüttelt das Röhrchen gut und läßt es über Nacht im Eisschrank stehen. Der Äther, das Schütteln und die Lagerung im Eisschrank helfen mit, die Phagpartikel gleichmäßig in der Bouillon zu verteilen. Zur Eliminierung des Äthers wird das Röhrchen am folgenden Tag für eine Stunde bei 37°C bebrütet. Die phaghaltige Bouillon kann nun im Platten-
testverfahren geprüft werden. Durch weitere Bouillonpassagen kann auch hier eine erhebliche Phaganreicherung erzielt werden.

b) Problem und Ziel meiner Untersuchungen.

Zur Erkennung und Differenzierung von Bakterien können verschiedene Wege beschritten werden.

Einmal gelingt es, mit serologischen Methoden Antigenfaktoren zu ermitteln und damit eine präzise Bestimmung des Bakterientyps herbeizuführen. Weitere Möglichkeiten der Typendifferenzierung von Bakterien bietet die biochemische Analyse. Durch Untersuchungen aus jüngster Zeit ergeben sich hier bemerkenswerte Möglichkeiten. Als besonders geeignete, differenzierende Methode zur Bestimmung von Bakterienarten hat sich schließlich die Typisierung mit Hilfe von Bakteriophagen erwiesen.

Der Erreger der weißen Kükenruhr und der Erreger des Hühnertyphus, die lange Zeit als zwei voneinander unabhängige Krankheitserreger angesehen wurden, gelten heute allgemein als identisch.

Durch serologische Untersuchungen wurde erwiesen, daß *S. gallinarum* (pullorum) aufgrund der somatischen Antigenstruktur 9 und 12 der Salmonellagruppe D zugehört. K a u f f m a n n (68) konnte feststellen, daß das O-Antigen 12 aus 3 Partialantigenen, 12_1 , 12_2 und 12_3 , besteht. Besondere Bedeutung kommt dem Partialantigen 12_2 zu, das einer Variation durch Formenwechsel unterliegen kann. In manchen Kulturen lassen sich Einzelkolonien, die das Partialantigen 12_2 nicht oder nur in geringem Maße enthalten, neben solchen, die es reichlich besitzen, feststellen. Die Nichtbeachtung dieser Tatsache kann bei der Serodiagnose leicht zu Irrtümern führen. Nach den Untersuchungen von E d w a r d s und B r u n e r (49) ist auch das Partialantigen 12_2 von *S. gallinarum* (pullorum) in gleicher Weise einem Formenwechsel ausgesetzt. Sie bezeichnen die Stämme, die nur wenig oder kein 12_2 -Antigen besitzen, als Standardstämme, solche Stämme, die 12_2 reichlich enthalten, als Variantenstämme. Einen Einblick in das serologische Verhalten der *S. gallinarum*-Stämme in Deutschland vermittelt uns R o o t s (95). Stämme, die das 12_2 -Antigen reichlich besitzen, werden als vollantigen charakterisiert, diejenigen Stämme, die 12_2 kaum oder nicht enthalten, als Minusvarianten definiert.

Zahlreiche Autoren versuchen, mit Hilfe biochemischer Untersuchungsmethoden das unterschiedliche Verhalten von Pullorum- bzw. Gallinarumstämmen zu erklären. So prüfte S t r a c k (121) neuerdings das Enzymgepräge von

S. gallinarum (pullorum), dem früher zur Trennung zwischen *S. gallinarum* und *S. pullorum* großer Wert beigemessen wurde. Dabei kommt er zu der Feststellung, daß fast alle 12₂++ Stämme aus vergärbaren Kohlehydraten Gas bilden, niemals jedoch 12₂[±] Pullorumstämmen. Verschiedene andere biochemische Eigenschaften sind sowohl den vollantigenen Stämmen als auch den Minusvarianten eigen.

Nur wenige Arbeiten beschäftigen sich bisher mit der Trennung der Erreger der weißen Kükenruhr und des Hühnertyphus durch Bakteriophagen (Thummes (123), Begano vi ć und Topolnik (9)). Dabei war vor allem die Frage zu klären, ob der Erreger der weißen Kükenruhr und des Hühnertyphus als identisch oder als getrennte Arten anzusehen sind.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, Phagen zu isolieren, die gegenüber *S. gallinarum* (pullorum) wirksam sind, deren Eigenschaften zu prüfen und mit ihrer Hilfe eine Differenzierung von *S. gallinarum*-Stämmen zu versuchen. Untersuchungen über die Antigenstruktur und der Nachweis der verschiedenartigen Antigenzusammensetzung bei den Gallinarumbakterien sind für die Serodiagnose, und damit für die Epidemiologie der weißen Kükenruhr, von großer Bedeutung. Da der Angriffspunkt eines Phagen mit dem O-Antigen von Bakterien korrespondieren kann, wird in Anbetracht der unterschiedlichen Antigenzusammensetzung von *S. gallinarum* auch eine unterschiedliche Phagempfindlichkeit für möglich gehalten. Inwieweit die Einteilung von *S. gallinarum* in vollantigene Stämme und Minusvarianten einer unterschiedlichen Phagempfindlichkeit parallel läuft, soll in den folgenden Untersuchungen geprüft werden.

c). Verlauf der Versuche.

A. Isolierung von Gallinarumbakteriophagen.

Seit den Untersuchungen von d' H é r e l l e (42) und H o d e r (66) ist bekannt, daß im Darminhalt des Huhnes Phagen in reichlichem Maße vorkommen. In Anlehnung an diese Beobachtung wurde hauptsächlich der Darminhalt von Hühnern auf Vorhandensein von Gallinarumbakteriophagen geprüft. Als Materialquelle dienten Hühner, die im Tierhygienischen Institut Freiburg zur Sektion vorlagen. Als Fundorte von Phagen können ferner Verdauungskanal bei Tier und Mensch, verunreinigte Erde und Abwasser, sowie die Bakterien selbst angesehen werden. Aus diesem Grund werden Kotproben von Rindern, die Ileocaecalklappe und die Tonsillen von Schweinen, der Darminhalt von mit *S. gallinarum* gefütterten Mäusen und verschiedene *S. gallinarum*-Stämme auf das Vorhandensein von Phagen geprüft.

Das verschiedenartige Ausgangsmaterial wurde jeweils zunächst zerkleinert, d.h. Darmteile, Ileocaecalklappe und Tonsillen des Schweines werden mit Seesand im Mörser klein zerrieben, in Reagenzgläser oder Erlenmeyerkölbchen gefüllt und mit gewöhnlicher Bouillon überschichtet. Dann fügt man einige Tropfen oder eine Öse einer jungen, 24 Stunden bebrüteten *S. gallinarum*-Kultur sowie 1 ml Tryptophan-Stammlösung zu. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C wird die Aufschwemmung durch Papierfilter passiert und so von den gröberen Bestandteilen befreit. Anschließend filtriert man durch Seitzfilter und erhält somit ein bakterienfreies Filtrat.

Auf diese Weise wurden insgesamt 183 Filtrate gewonnen. Nach Herkunft des Materials ergibt sich nachstehende Übersicht :

1. 160 Filtrate aus Darminhalt von verstorbenen Hühnern mit verschiedener Todesursache.
2. 9 Filtrate aus zerkleinerten Ileocaecalclappen und Tonsillen geschlachteter oder verendeter Schweine.
3. 3 Filtrate aus Darminhalt von Rindern.
4. 6 Filtrate aus Darminhalt von Mäusen, die mit *S. gallinarum*-Kulturen gefütterte wurden. Jeweils 2 Mäuse erhielten auf die Dauer von 10 Tagen Kulturmaterial der 12₂++ *S. gallinarum*-Stämme. Nach Ablauf dieser Zeitspanne erfolgte die Tötung und Prüfung des Darmes auf Phagengehalt.

5. 5 Filtrate, gewonnen durch mehrfache Bouillonpassage verschiedener *S. gallinarum*-Stämme (Stamm G, E, D, F und C). Auf diese Weise sollte die Isolierung temperierter Phagen ermöglicht werden.

B. Prüfung der isolierten Gallinarumphagen.

1. Prüfung von Gallinarumphagen gegenüber *Salmonella gallinarum*-Stämmen.

Die Prüfung sämtlicher Filtrate erfolgte im Plattentestverfahren mit der Wasserblau-Dextrose-Agarplatte. Für die Untersuchungen standen zunächst 2 serologisch einwandfrei definierte *S. gallinarum*-Stämme zur Verfügung:

1. Stamm D = 2868 (12₂++)
2. Stamm E = 244 (12₂±)

Ein großer Teil der gewonnenen Filtrate zeigte sowohl dem Stamm D als auch Stamm E gegenüber alle Symptome einer echten Phagwirkung.

Einen ersten Überblick über das Ergebnis der an den Stämmen D und E geprüften Filtrate vermittelt nachstehende Tabelle:

Tab. I

<u>Herkunft der Filtrate</u>	Anzahl der gepr. Filtr.	<u>davon phagaktiv</u>	
		gg. Stamm D+E	<u>nur gg.</u> Stamm E
1. Darminhalt von Hühnern	160	75	31
2. Ileocaecalklappen und Tonsillen von Schweinen	9	1	-
3. Darminhalt von Rindern	3	-	1
4. Darminhalt von mit <i>S.</i> <i>gallinarum</i> gefütterten Mäusen	6	6	-
5. <i>S. gallinarum</i> -Kulturen	5	-	1
zusammen	183	82	33

Das Ergebnis von Tabelle I kann wie folgt zusammengefaßt werden:

1. 66 % der geprüften Hühnerkotproben weisen aktive Phagen gegenüber *S. gallinarum* auf. Besonders groß ist die Zahl der Phagen, die gegenüber dem 12₂-freien Stamm E Aktivität zeigen. Phagen mit spezifisch lysogenen Eigenschaften gegen den 12₂-haltigen Stamm D ließen sich im Rahmen der geprüften Filtrate nicht feststellen. Sämtliche D-Stamm aktiven Phagen erwiesen sich in gleicher Weise an E-Stämmen lysogen.

Da Phagen, die nur den 12₂-haltigen Stamm D angreifen, in den untersuchten Hühnerkotproben nicht gefunden werden können, wird in der Folge auf andere Substrate, die als Phagreservoir bekannt sind, zurückgegriffen.

2. Auch im Verdauungstrakt des Schweines können aktive Phagen gegen *S. gallinarum* nachgewiesen werden. Hier handelt es sich ebenfalls ohne Ausnahme um Phagen mit gleichzeitiger Aktivität gegen Stamm D und Stamm E.
 3. Bei der Untersuchung von 3 Rinderkotproben wird ein positives Phagfiltrat ermittelt, das jedoch nur gegen den Stamm E ($12_2^{\pm}$) wirksam ist.
 4. Aus dem Darm von 6 Mäusen, die zuvor 10 Tage lang nur mit 12_2 -haltigen *S. gallinarum*-Stämmen (A, B und D) gefüttert wurden, lassen sich 6 positive Filtrate ermitteln. Alle Filtrate zeigen Phagwirkung sowohl gegenüber Stamm E als auch gegenüber Stamm D.
 5. Da Bakterienstämme Träger von temperierten Phagen sein können, werden mehrere Bouillonpassagen mit den *S. gallinarum*-Stämmen G, E, D, F und C durchgeführt. Dabei erweist sich der Stamm G als Träger eines temperierten Phagen. Bei der Prüfung des Phagen am Trägerstamm G können Phagphänomene nicht ermittelt werden. Umso aktiver zeigt sich dieser Phage im Kontakt mit $12_2^{\pm}$ *S. gallinarum*-Stämmen.
- Im allgemeinen treten bei der Prüfung frisch gewonnener Filtrate Unterschiede in der Phagaktivität zutage. Wenn als Maß für Aktivität Art und Fähigkeit zur Lyse gelten sollen, dann zeigen sich von der konfluenten Lysis bis zur Plaques-Bildung alle Übergänge.
- Das Ergebnis der ersten Prüfung besteht somit in der Isolierung von 2 *S. gallinarum*-aktiven Phagtypen:
- Solche Filtrate, die auf beide im Vorversuch benützte *S. gallinarum*-Stämme (Stamm E und Stamm D) lytisch wirken,
 - solche Filtrate, die nur den Stamm E angreifen und dem Stamm D gegenüber keine Wirkung zeigen.

Weitere Untersuchungen sollten klären, inwieweit die im Vorversuch ermittelte Zuordnung *S. gallinarum*-aktiver Phagtypen aufrecht erhalten werden kann.

Für diesen Zweck werden sämtliche positive Phagfiltrate an einer Vielzahl weiterer *S. gallinarum*-Stämme auf Aktivität geprüft. Die bereits im Vorver-

such ermittelte, unterschiedliche Phagwirkung gegenüber Stamm D und Stamm E wird hierbei berücksichtigt.

Aus der Vielzahl der gewonnenen Filtrate werden 12 ausgewählt und im Plaque-Testverfahren auf Aktivität geprüft. Es handelt sich dabei um die Filtrate: 110, 68, 260, 261, 80, 81 (aktiv gg. 12_2^{++} und $12_2^{\pm}$ S.gallinarum-Stämme) und die Filtrate 116, 118, 143, 223, 1 und 2 (aktiv nur gegen $12_2^{\pm}$ S.gallinarum-Stämme).

Die Aktivität der Filtrate gegenüber den vorhandenen *S. gallinarum*-Stämmen gibt die Tabelle II wieder. Tab. II.

110	68	260	261	80	81	116	118	143	223	1	2
-----	----	-----	-----	----	----	-----	-----	-----	-----	---	---

a) Original-Test-Stämme

D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++

b) 12_2^{++} Test-Stämme = vollantigene Stämme

A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
F	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
H	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
K	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
P ₂	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
P ₅	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
P ₇	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
P ₈	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
P ₉	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
R	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Q	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
U	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
V	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
W	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
X	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Y	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Z	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
A ₁	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
B ₁	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-

c) 12_2^+ Test-Stämme = Minusvarianten

M	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
N	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
O	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++	+++	+++	+++
P	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++/+++	+++	+++	+++
P ₁	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
S	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	+++	+++	+++
C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	+	+++	+++	+++

Zeichenerklärung: Lateinische Buchstaben:	Testkulturen
Arabische Zahlen	: Phagfiltrate
+++	: totale Lysis
++/+++	: partielle Lysis
++	: mehrere Plaques
+	: ein Plaque

Die in der Vorprüfung benützten Teststämme D und E erscheinen in der Tabelle unter a). Dann folgt die Gruppe der übrigen 12_2++ S.gallinarum-Stämme unter b) und daran anschließend diejenigen S.gallinarum-Stämme, die mit dem Stamm E identisch sind, also das O-Antigen 12_2 nicht oder nur in geringer Menge enthalten, unter c).

In der Tabelle erscheinen Phagfiltrate, die alle aufgeführten S.gallinarum-Stämme lösen. Andere Filtrate hingegen scheinen spezifische Wirksamkeit gegenüber den 12_2^+ S.gallinarum-Stämmen zu besitzen. Dabei kann der Lysegrad gegenüber den einzelnen Stämmen schwanken.

Gegen den S.gallinarum-Stamm G, der sich als Träger eines temperierten Phagen erwies, war ein Testen der Filtrate nicht möglich.

Im Verlauf der bisherigen Versuche ließen sich spezifische Phagen isolieren, die allen geprüften S.gallinarum-Stämmen gegenüber Aktivität zeigten. Daneben erscheint die Annahme der Existenz von Phagen mit spezifischer Wirkung auf 12_2^+ S.gallinarum-Stämme berechtigt. Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang es jedoch nicht, Phagen mit spezifischer Aktivität auf 12_2++ S.gallinarum-Stämme nachzuweisen. Wohl zeigten Phagen mit gleichzeitigem Lysevermögen an Stamm D und E oder anderen, im Antigenaufbau entsprechenden Kulturen gewisse Aktivitätsunterschiede. In der Regel wird der Stamm D von ein und demselben Phagfiltrat stärker gelöst als der Stamm E.

Dies war besonders deutlich bei dem Filtrat 68. Im Testverfahren auf Wasserblau-Dextrose-Agarplatte führte das originale Filtrat auf Stamm D noch in einer Verdünnung von 10^{-12} zur Plaquesbildung. Auf Stamm E war bereits bei einer Filtratverdünnung von 10^{-8} kein Lyseeffekt mehr nachzuweisen, wie aus Tabelle III hervorgeht.

Tab. III.

Filtratverdünnung:

Filtrat:

68 Stamm:	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
D	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++	++	++	++	+	+
E	++/+++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-

Mit dem originalen Filtrat 68 wurde anschließend durch fortlaufende Bouillonpassage eine Adaption an den Stamm D versucht. Auf diese Weise sollte ein Filtrat mit spezifischer Aktivität auf Stamm D und gleichzeitiger Einbuße seiner lytischen Fähigkeit gegenüber Stamm E erzielt werden. Das Ergebnis wird durch Tab. IV veranschaulicht.

Tab. IV.

Filtratverdünnung:

Filtrat:

68 Stamm:	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}	10^{-15}	10^{-16}	10^{-17}
D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++	++	++	++	++	+	+	-
E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++	++	++	++	++	+	+	+	-

Durch die Bouillonpassagen wurde somit nicht nur die Aktivität gegenüber dem Stamm D, sondern in gleichem Maße auch diejenige gegenüber Stamm E gesteigert.

Nach diesem Fehlergebnis wurde nun versucht, auf andere Weise die Adaptation von Phagen an 12_2++ S.gallinarum-Stämme zu verwirklichen.

Zu diesem Zweck werden Wasserblau-Platten mit Kulturmateriel des S.gallinarum-Stammes D beimpft und mit stark verdünntem Phagfiltrat in Kontakt gebracht. Dadurch erzielte Plaques werden aus der Platte ausgestochen und im Ätherverfahren angereichert. Nach mehrfacher Anreicherung wird das Filtrat in seiner kritischen Testkonzentration (CTC) gegenüber Stamm D und Stamm E getestet.

Aber auch durch Anwendung dieser Methode konnten keine spezifisch nur gegen 12_2++ S.gallinarum-Stämme wirkenden Phagen gewonnen werden.

Das Ergebnis der vorstehenden Untersuchungen ist wie folgt zusammenzufassen:

Es ist gelungen, aus Hühnerkotproben S.gallinarum-aktive Phagen zu gewinnen, die entweder nur 12_2^+ S.gallinarum-Stämme oder 12_2++ sowie gleichzeitig 12_2^+ S.gallinarum-Stämme angreifen. Aus demselben Material konnten jedoch Phagen mit monospezifischer Aktivität auf 12_2++ S.gallinarum-Stämme nicht isoliert werden.

In Anbetracht dieser Sachlage wurden zahlreiche weitere Substrate auf die Existenz derartiger Phagen geprüft: Teile des Verdauungskansals vom Schwein, ferner Darminhalt von Rindern sowie von Mäusen, die mit 12_2++ S.gallinarum-Stämmen gefüttert waren, dienten vornehmlich als Ausgangsmateriel. Zur Phaganreicherung werden nur solche S.gallinarum-Stämme zugesetzt, die das Teilantigen 12_2 besitzen. Im übrigen wird wie bei der Aufbereitung der Hühnerkotproben verfahren.

Aus zerkleinerten Tonsillen und Ileocaecalklappen von 9 Schweinen konnte nur in einem Fall ein gegen *S.gallinarum* aktiver Phage gewonnen werden. Auch dieser Phage löste alle *S.gallinarum*-Stämme.

Aus den Rinderkotproben wurde ein $12^{\pm}$ *S.gallinarum*-Stämme angreifender Phage isoliert.

Im Darm von 6 Mäusen, von denen jeweils 2 Mäuse 10 Tage lang mit Stamm A, B und D gefüttert wurden, konnten 6 positive Phagfiltrate festgestellt werden. Sie zeigten jedoch wiederum gegenüber allen *S.gallinarum*-Stämmen Lysevermögen.

Auch der Wechsel des Ausgangsmaterials war somit nicht geeignet, spezifische Phagen gegen 12_{2++} *S.gallinarum*-Stämme zu finden.

Als weitere Phagenquelle sind die Bakterienstämme selbst anzusehen. Sie können als lysogene Stämme einen Prophagen beherbergen, der erst durch einen kleinen, das Stoffwechselgleichgewicht der Zelle störenden Reiz in Freiheit gesetzt wird. So wurden die *S.gallinarum*-Stämme G, E, D, F und C auf Prophagen untersucht.

Zu diesem Zweck werden Bouillonkulturen mit Tryptophanzusatz angesetzt und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach Filtration der erhaltenen Bouillonkultur durch Seitzfilter und Zugabe von etwa 1 ml dieses Filtrats zu einer neuen *S.gallinarum*-Bouillonkultur wird nochmals bebrütet und anschließend filtriert. Diese Passagen werden 5 - 7 mal durchgeführt. Im Plattentest konnte der *S.gallinarum*-Stamm G als Wirt eines Prophagen ermittelt werden. Das derart gewonnene Filtrat zeigte jedoch nur gegenüber den $12_2^{\pm}$ *S.gallinarum*-Stämmen Aktivität.

2. Prüfung von Gallinarumphagen gegenüber anderen Bakterienarten (Kreuztest).

Nach allgemeinen Erfahrungen werden im tierischen Organismus am häufigsten Phagen gefunden, die gegenüber der Coli-, Typhus- und Ruhrgruppe wirksam sind. Daneben gelang aber auch die Isolierung von Phagen mit spezifischer Aktivität auf grampositive Bakterien, Kokken sowie gramnegative Keime. Meine weiteren Untersuchungen sollten Aufschluß darüber erteilen, ob den *S. gallinarum*-aktiven Filtraten eine spezifische Aktivität zukommt, oder ob es sich um Phagen mit polyvalenten Eigenschaften handelt. Als Basis für diese Kreuzungsteste dienen Stämme der Gattungen *Salmonella*, *Shigella*, *Corynebacterium* und *Micrococcus* (Tab. V).

Die Prüfung der gegen *S. gallinarum* positiven Phagfiltrate hat somit teilweise eine gekreuzte Aktivität gegenüber *S. typhi-murium* ergeben. Alle anderen Bakterienstämme verschiedenster Gattungen werden von den geprüften Filtraten nicht beeinflußt.

C. Anreicherung der *S. gallinarum*-Phagen und Bestimmung ihrer kritischen Konzentration

Durch Passagen an lebenden *S. gallinarum*-Stämmen ist es möglich, die Wirkung frisch isolierter Phagfiltrate zu steigern.

Zur Erhöhung der Phagaktivität werden mit den Filtraten 81, 260, 223 und 143 Passagen durchgeführt. Dabei ist streng darauf zu achten, daß die Anreicherung der Filtrate nur in Gegenwart homologer Organismen stattfindet. Bei Nichtbeachtung dieser Forderung muß mit dem Auftreten von Phagmutationen gerechnet werden, die jede exakte Untersuchung unmöglich machen. Jedes Filtrat durchläuft hierbei insgesamt 10 Bouillonpassagen. Als Maß für die erreichte Phagaktivität gilt die sog. kritische Konzentration (= CTC).

Unter k r i t i s c h e r K o n z e n t r a t i o n versteht man diejenige Phagverdünnung, die auf der Platte gerade noch im Stande ist, totale Lysis auszulösen. Zur Bestimmung der kritischen Konzentration eines Filtrats stellt man eine Verdünnungsreihe des Filtrats her und prüft die einzelnen Filtratverdünnungen im Plattentestverfahren auf Wirksamkeit. Die Verdünnungsreihe wird wie folgt angelegt.

Etwa 10 Reagenzröhrchen werden jeweils mit 1,8 ml gewöhnlicher Bouillon beschickt und im Dampftopf sterilisiert. Dem ersten Röhrchen der Verdünnungsreihe mit 1,8 ml Bouillon fügt man 0,2 ml konzentriertes Phagfiltrat zu. Somit erhält man eine Verdünnung des Phagfiltrats von 1:10 oder 10^{-1} . Aus den ersten Röhrchen werden wieder 0,2 ml entnommen und in das zweite Röhrchen überpipettiert. Dadurch wird das Filtrat 100fach verdünnt; das entspricht einem Verdünnungsgrad von 10^{-2} . Durch weiteres Überpipettieren von 0,2 ml der jeweiligen Filtratverdünnung in die folgenden Röhrchen usw. gelangt man zu immer höheren Verdünnungsgraden, so daß das fünfte Röhrchen einer Verdünnung von 10^{-5} und das 6. Röhrchen einer Verdünnung von 10^{-6} entspricht. Die durch Passagen erzielte Aktivitätssteigerung der Phagfiltrate wird durch

den Test der kritischen Konzentration vor der Passage, nach der 6. und nach der 10. Passage bewertet.

Die kritische Konzentration der Phagfiltrate direkt nach ihrer Isolierung beträgt höchstens 10^0 bis 10^{-1} . Einige Filtrate (z.B. Filtrat 223) zeigen bei der Prüfung vor der ersten Anreicherungspassage nur Plaquebildung und keine totale Lysis.

Nachstehende Tabelle VI gibt die Verdünnungsreihe und die CTC der Phagfiltrate 81, 260, 223 und 143 nach der 6. Bouillonpassage wieder.

Tab. VI.

Filtrat:	Filtratverdünnungen								CTC
81 Stamm	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
D	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	10^{-5}
E	+++	+++	+++	+++	++/+++	++	++	++	

Filtrat:	Filtratverdünnungen								
260 Stamm	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	10^{-6}
E	+++	+++	+++	+++	++/+++	++	+	+	

Filtrat:	Filtratverdünnungen								
223 Stamm	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	10^{-6}
P ₁	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++	++	++	
C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	

Filtrat:	Filtratverdünnungen								
143 Stamm	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	10^{-6}
P ₁	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++	++	++	+	
C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	

Die Feststellung der kritischen Konzentration nach der 6. Bouillon-passage zeigt, daß eine erhebliche Aktivitätssteigerung mit Hilfe der Passage erreicht werden kann. Alle hier aufgeführten Filtrate weisen eine kritische Konzentration von 10^{-5} bzw. 10^{-6} auf.

Nach der 10. Bouillonpassage ergibt sich für die Phagfiltrate 81, 260, 223 und 143 folgende CTC (Tabelle VII).

Tab. VII.

Filtrat: 81 Stamm								CTC
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	10^{-6}

Filtrat: 260 Stamm								10^{-6}
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	
E	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++	++

Filtrat: 223 Stamm								10^{-7}
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
P ₁	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++	
C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++

Filtrat: 143 Stamm								10^{-6}
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	
P ₁	+++	+++	++/+++	++/+++	++	++	++	
C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

Die Ergebnisse machen deutlich, daß die Aktivität der Phagen durch weitere Bouillonpassagen nicht mehr wesentlich gesteigert werden kann. Die CTC der an verschiedenen Stämmen von *S. gallinarum* geprüften Phagfiltrate kann mit 10^{-5} bis 10^{-7} angegeben werden. Hinsichtlich der Aktivität gegenüber den einzelnen *S. gallinarum*-Stämmen sind jedoch gewisse Unterschiede festzustellen.

D. Eigenschaften von Gallinarumphagen gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen.

Inwieweit chemisch und physikalisch wirkende Stoffe die Aktivität von Gallinarumphagen beeinflussen können, soll durch nachstehende Versuche beleuchtet werden.

1. Methylenblaresistenz der *S. gallinarum*-Phagen.

Methylenblau ist imstande, bei Einwirkung von Licht und in Gegenwart von Sauerstoff Phagen zu inaktivieren. Man spricht deshalb von einer photodynamischen Wirkung des Methylenblaus.

In den folgenden Versuchen werden 4 Phagfiltrate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber verschieden starken Methylenblaulösungen geprüft.

Für die Versuche finden die Filtrate 143 und 223 (aktiv gegen 12_2^+ *S. gallinarum*-Stämme) und die Filtrate 261 und 81 (aktiv gegen 12_2^+ und 12_{2++} *S. gallinarum*-Stämme) Verwendung. Der Empfindlichkeitstest erfolgt mit konzentrierten Phagfiltraten sowie den Verdünnungen bis zur CTC. Die inaktivierende Wirkung von Methylenblau wird in Verdünnungen von 1:20000, 1:10000, 1:5000 und 1:1000 geprüft.

Als Ausgangslösungen dienen 0,05 %-, 0,1 %-, 0,2 %- und 1 %ige wässrige Methylenblaulösungen, die im Dampftopf sterilisiert und im Dunkeln aufbewahrt werden.

Jedes Filtrat wird 4 mal bis zur 5. Potenz verdünnt, so daß 4 Verdünnungsreihen zur Verfügung stehen. Jedes Röhrchen wird mit 1,8 ml Bouillon beschickt. Dann erhält das erste Röhrchen 0,2 ml konzentriertes Phagfiltrat zugesetzt, was einer Verdünnung von 10^{-1} entspricht. Von dieser 1:10 ver-

dünnten Phaglösung werden jeweils 0,2 ml in das zweite Röhrchen usw. überpipettiert. Jede Verdünnungsreihe schließt somit die Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-5} ein. Weiterhin erhält jede Verdünnungsreihe pro Röhrchen einen Zusatz von 0,2 ml wässriger Methylenblaulösung in entsprechender Verdünnung. Daraus ergibt sich folgendes Bild:

1. Reihe 0,2 ml der 0,05%igen wässrigen Methylenblaulösung,
2. Reihe 0,2 ml der 0,1%igen wässrigen Methylenblaulösung,
3. Reihe 0,2 ml der 0,2%igen wässrigen Methylenblaulösung,
4. Reihe 0,2 ml der 1,0%igen wässrigen Methylenblaulösung.

Die Reihen 1 bis 4 enthalten somit folgende Methylenblaukonzentrationen:

- | | | | |
|-----------|---|---|--------|
| 1. Reihe: | 1 | : | 20000, |
| 2. Reihe: | 1 | : | 10000, |
| 3. Reihe: | 1 | : | 5000, |
| 4. Reihe: | 1 | : | 1000. |

Die Einwirkung von Methylenblau auf Phagfiltrat erfolgt für 1, 6, 9 und 24 Stunden bei 37°C . Selbstverständlich muß durch Vorversuche die Unempfindlichkeit von *S.gallinarum* gegenüber Methylenblau gewährleistet sein.

Die folgenden Tabellen zeigen in ihren einzelnen Teilen VIII a - d die Wirkung der verschiedenen Methylenblaukonzentrationen auf die Verdünnungsreihe der Phagfiltrate 143, 223, 261 und 81.

Tab. VIII a).

Filtrat: 143 Methylen- blaukonzen- trationen	Einwir- kungszeit in Std.	Phagverdünnungen					Kontrolle 1,8 ml. Bouillon
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ =CTC	
1 : 20000	1	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	-
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++/+++	++	
1 : 5000		+++	++/+++	++/+++	++/+++	+	
1 : 1000		+++	++	+	+	-	
1 : 20000	6	+++	+++	++/+++	++	++	-
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++	+	
1 : 5000		+++	++/+++	++	++	-	
1 : 1000		+++	++	+	+	-	
1 : 20000	9	+++	++/+++	++/+++	++	+	-
1 : 10000		++/+++	++/+++	++/+++	+	-	
1 : 5000		+++	++/+++	++	+	-	
1 : 1000		+++	++	+	-	-	
1 : 20000	24	+++	++/+++	+	+	-	-
1 : 10000		++/+++	++	+	-	-	
1 : 5000		+++	++	+	-	-	
1 : 1000		++	++	-	-	-	

Tab. VIII b).

Filtrat: 223		Phagverdünnungen					Kontrolle
Methylen- blaukonzentrationsen	Einwirkungszeit in Std.	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5} =CTC	1,8 ml Bouillon
1 : 20000	1	+++	+++	++/+++	++/+++	++	-
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++/+++	+	
1 : 5000		+++	+++	++/+++	++/+++	+	
1 : 1000		+++	++	+	+	-	
1 : 20000	6	+++	+++	++/+++	++	+	-
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++	+	
1 : 5000		+++	++/+++	++	+	-	
1 : 1000		+++	++	+	-	-	
1 : 20000	9	+++	++/+++	++/+++	++	-	-
1 : 10000		++/+++	++/+++	++/+++	+	-	
1 : 5000		+++	++/+++	+	+	-	
1 : 1000		+++	++	+	-	-	
1 : 20000	24	+++	++/+++	+	+	-	-
1 : 10000		++/+++	++	+	-	-	
1 : 5000		+++	++	+	-	-	
1 : 1000		++	++	-	-	-	

Tab. VIII c).

Filtrat: 261		Phagverdünnungen					Kontrolle
Methylen- blaukonzentrationen	Einwirkungszeit in Std.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ =CTC	1,8 ml Bouillon
1 : 20000	1	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	-
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++/+++	++	
1 : 5000		+++	++/+++	++/+++	++/+++	++	
1 : 1000		+++	++	++	+	-	
1 : 20000	6	+++	+++	++/+++	++/+++	++	-
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++	+	
1 : 5000		+++	+++	++/+++	+	-	
1 : 1000		+++	++	+	-	-	
1 : 20000	9	+++	++/+++	++/+++	++	++	-
1 : 10000		+++	++/+++	++/+++	+	-	
1 : 5000		+++	++/+++	++	+	-	
1 : 1000		+++	++	+	-	-	
1 : 20000	24	+++	++/+++	+	+	-	-
1 : 10000		+++	++	+	-	-	
1 : 5000		+++	++	+	-	-	
1 : 1000		++	++	-	-	-	

Tab. VIII d).

Filtrat: 81							Kontrolle
Methylen- blaukonzen- trationen	Einwir- kungszeit in Std.	Phagverdünnungen					1,8 ml Bouillon
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ =CTC	
1 : 20000	1	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	—
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++/+++	++	
1 : 5000		+++	+++	++/+++	++/+++	+	
1 : 1000		+++	++	++	+	—	
1 : 20000	6	+++	+++	++/+++	++	++	—
1 : 10000		+++	+++	++/+++	++	+	
1 : 5000		+++	++/+++	++/+++	+	—	
1 : 1000		+++	++	+	—	—	
1 : 20000	9	+++	++/+++	++/+++	++	+	—
1 : 10000		+++	++/+++	++	+	—	
1 : 5000		+++	++/+++	++	—	—	
1 : 1000		++/+++	++	—	—	—	
1 : 20000	24	+++	++/+++	+	+	—	—
1 : 10000		+++	++	+	—	—	
1 : 5000		+++	+	+	—	—	
1 : 1000		++	+	—	—	—	

Durch Methylenblau in verschiedenen Konzentrationen wird nach einer Einwirkungszeit von 1, 6, 9 und 24 Stunden die Phagaktivität somit nicht zu erheblich beeinflusst. Bei höherer Phagverdünnung nimmt die Lysefähigkeit proportional der Einwirkungszeit und der Methylenblaukonzentration ab. So führen Phagfiltrate in der CTC in Gegenwart definierter Konzentrationen von Methylenblau nur noch zu semikonfluenter Lysis oder Plaquesbildung. Erst nach Einwirkung von 9 oder 24 Stunden verlieren Phagen selbst in Gegenwart stark verdünnter Methylenblaulösungen ihre Aktivität.

Wie vorstehende Tabelle erkennen läßt, ist die inaktivierende Wirkung des Methylenblaus abhängig: 1. Von der Höhe der verwendeten Methylenblaukonzentration, 2. von der Dauer der Einwirkung und 3. von der Phagverdünnung, d.h. von der vorhandenen Teilchenzahl.

2. pH-Resistenz der Gallinarumphagen.

In der Mehrzahl der bisherigen Phagexperimente vollzieht sich der Reaktionsablauf in einem Milieu von pH 7,0 bis 8,0. Dieser Bereich der Wasserstoffionenkonzentration sichert den Phagen optimale Wirkung. Inwieweit niedere bzw. hohe pH-Werte die Aktivität von Gallinarumphagen beeinträchtigen können, sollte in den folgenden Versuchen geprüft werden.

Als Testfiltrate dienen Nr. 261, 81, 223 und 143, die in einem pH-Bereich zwischen 4,0 und 10,0 geprüft werden.

Ausgehend von einer größeren Menge Phagfiltrat (pH 7,0) in der CTC werden jeweils 10 ml in Röhrchen überpipettiert. Danach stellt man die einzelnen Röhrchen auf nachfolgende pH-Werte ein: 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 8,0; 9,0; 9,5 und 10,0 und bebrütet für 18 bzw. 36 Stunden bei 37° C. Anschließend werden die einzelnen Filtrate im Plattentestverfahren auf ihre Wirksamkeit überprüft. Bei pH 4,0; 4,5 und 10,0 beobachtet man innerhalb der Filtratbouillon vielfach Eiweißausfällungen. Hierbei handelt es sich um Nährbodeneiweiß, das die Phagaktivität im Rahmen dieser Untersuchungen kaum beeinflussen dürfte.

Die Filtrate 261 und 81 werden auf *S.gallinarum*-Stamm D, die Filtrate 223 und 143 auf *S.gallinarum*-Stamm E im Plattentestverfahren geprüft.

Tab. IX.

Prüfung nach 18 Stunden.

Filtrat:	Wasserstoffionenkonzentrationen							
	4,0	4,5	5,0	6,0	8,0	9,0	9,5	10,0
261	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
81	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
223	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
143	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrolle: Nur Bouillon (ohne Filtrat)	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. X.

Prüfung nach 36 Stunden.

Filtrat:	Wasserstoffionenkonzentrationen							
	4,0	4,5	5,0	6,0	8,0	9,0	9,5	10,0
261	++	++	++/+++	+++	+++	+++	+++	++/+++
81	++	++/+++	++/+++	+++	+++	+++	+++	++/+++
223	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++
143	++/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/+++
Kontrolle: Nur Bouillon (ohne Filtrat)	-	-	-	-	-	-	-	-

Als Ergebnis ist festzustellen, daß im pH-Bereich von 6,0 bis 9,0 die Aktivität von Gallinarumphagen unbeeinflusst bleibt. Bei pH 4,0 ist nach 18stündiger Wirkung die Aktivität herabgesetzt, was nach 36stündiger Einwirkung noch eindeutiger in Erscheinung tritt. Dieses Verhalten trifft vornehmlich für solche Phagen zu, die sowohl gegen vollantigene Stämme als auch gegenüber Minusvarianten in gleicher Weise aktiv sind. Ebenso erleiden alle Phagen nach 36stündigem Aufenthalt in Bouillon bei pH 10,0 einen Aktivitätsverlust. Als Symptom hierfür kann gelten, daß sie ausnahmslos nur noch zur partiellen Lysis fähig sind.

3. Formalinempfindlichkeit der Gallinarumphagen.

In neuen Versuchen haben H e i c k e n und S p i c h e r (64) über die Kinetik der Formalininaktivierung von Phagen berichtet. Es handelt sich bei diesem Vorgang um eine Proteininaktivierung, wie R o s s und S t a n l e y (96) schon seit längerem beweisen konnten. In nachstehenden Versuchen wird Formalin 1%ig bei verschieden langen Einwirkungszeiten auf Gallinarumphagen in der CTC geprüft.

Jeweils 2 ml Phagfiltrat werden in sterile Röhrchen abgefüllt. Nach Zugabe von 1 ml der 1%igen Formaldehydlösung wird der ganze Röhrcheninhalt gut durchgeschüttelt. Nach Formalineinwirkung von 1, 2, 5, 10 und 20 Minuten werden die einzelnen Phagfiltrate auf Wirksamkeit geprüft.

Das Ergebnis der Prüfung zeigt folgende Tabelle:

Tb. XI.

Filtrate	Dauer der Formalineinwirkung in Minuten				
	1	2	5	10	20
260	+++	+++	+++	-	-
261	+++	+++	+++	-	-
81	+++	+++	+++	-	-
143	+++	+++	+++	-	-
118	+++	+++	+++	-	-
223	+++	+++	+++	-	-
Kontrollen:					
2 ml Filtrat + 1 ml Bouillon	+++	+++	+++	+++	+++
2 ml Bouillon + 1 ml 1% Formalin	-	-	-	-	-

Die Gallinarumphagen erweisen sich somit nach Formalineinwirkung auf die Dauer von 1, 2 und 5 Minuten noch vollkommen aktiv; im Plattentest zeigen alle Filtrate im Bereich der Beimpfung totale Lysis. Bei 10 Minuten dauernder Formalineinwirkung ist jedoch keine Phagwirkung mehr nachzuweisen.

4. Zitratempfindlichkeit der Gallinarumphagen.

Weitere Untersuchungen hatten das Verhalten von Gallinarumphagen gegenüber Zitrat salzen zum Ziel. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Gallinarumphagen bei Gegenwart von Natriumzitat ihre Lysebefähigung beibehalten oder nicht. Zu diesem Zweck wird Natriumzitat in 1 %-, 5 %-, 10 %- und 15 %iger Lösung verwendet. Als Ausgangslösung stellt man sich am besten eine 20%ige, sterile Zitratlösung her.

Um nun in den einzelnen Röhrchen die gewünschte Zitratkonzentration zu erhalten, verf hrt man in nachstehender Weise:

Zusammen- setzung	bei einer Zitratkonzentration von :			
	1 ‰	5 ‰	10 ‰	15 ‰
Gew�hnl. Bouillon	8,0	6,0	3,5	1,0 ml
Tryptophan- stammlösung	1,0	1,0	1,0	1,0 ml
Zitratzusatz der 20 ‰igen Lösung	0,5	2,5	5,0	7,5 ml
Phagfiltrat- zusatz	0,5	0,5	0,5	0,5 ml
	10,0	10,0	10,0	10,0

Es werden die 4 Filtrate: 260, 81 (aktiv gegen 12_2^{++} und $12_2^{\pm}$ S.gallinarum-Stämme) sowie 143 und 118 (aktiv gegen $12_2^{\pm}$ S.gallinarum-Stämme) auf ihr Verhalten gegenüber 1‰-, 5‰-, 10‰- und 15‰iger Zitratlösung im Plattentestverfahren auf Stamm D und E bzw. nur auf Stamm E geprüft. Zu- vor muß man sich über die Unempfindlichkeit von S.gallinarum-Stämmen gegenüber den genannten Zitratkonzentrationen verl ssigen. Die Prüfung nach 24st ndigem Bebrüten ergibt folgendes Verhalten der einzelnen Fil- trate:

Tab. XII.

a) Filtrat: Zitratlösungen

260	1 %	5 %	10 %	15 %
Stamm				
D	+++	+++	+++	++/+++
E	+++	++/+++	++/+++	++

b) Filtrat: Zitratlösungen

81	1 %	5 %	10 %	15 %
Stamm				
D	+++	+++	+++	++/+++
E	+++	++/+++	++	++

c) Filtrat: Zitratlösungen

143	1 %	5 %	10 %	15 %
Stamm				
E	+++	+++	+++	+++

d) Filtrat: Zitratlösungen

118	1 %	5 %	10 %	15 %
Stamm				
E	+++	+++	+++	+++

Die Filtrate 143 und 118 behalten in Gegenwart von Natriumzitat ihre volle Wirksamkeit bei. Dagegen erfahren die Filtrate 260 und 81 eine gewisse Schwächung, was bei der Zitratkonzentration von 15 % auf Stamm D und beim Testen auf Stamm E schon bei einer Zitratkonzentration von 5 % sichtbar wird.

5. Harnstoffempfindlichkeit der Gallinarumphagen.

B u r n e t (30) stellte durch Versuche fest, daß kleine Phagen einer Harnstoffeinwirkung gegenüber mehr Widerstand entgegensetzen als große. Die Größe der Gallinarumphagen wurde von S p a l a t i n (118) durch Ultrafiltration mit 17-25 m μ ermittelt. Im Vergleich mit anderen Phagen handelt es sich demnach um relativ kleine Partikel.

In den nun folgenden Versuchen soll das Verhalten der Gallinarumphagen 260, 81 (aktiv gegenüber 12₂++ und 12₂[±] S.gallinarum-Stämmen), 143 und 118 (aktiv gegenüber 12₂[±] S.gallinarum-Stämmen) in Gegenwart von 1 %-, 5 %-, 10 %- und 15 %iger Harnstofflösung geprüft werden.

Zur Arbeitserleichterung geht man wieder von einer 20 %igen Harnstofflösung aus. Die einzelnen Harnstoffverdünnungen werden nach dem im Zitratversuch angegebenen Schema angesetzt.

Im Gegensatz zu der bisher üblichen Verfahrensweise erfolgt die Prüfung der Filtrate im Bouillontestverfahren. Den einzelnen Harnstoffverdünnungen setzt man einige Tropfen einer 24 Stunden alten S.gallinarum-Kultur zu. Es ist streng darauf zu achten, daß mit Filtrat 260 und 81 beschickte Harnstoffverdünnungen Kulturmateriel von Stamm D oder E erhalten. Bei den Filtraten 143 und 118 kommt nur der Zusatz von Stamm E in Frage. Nach 24 Stunden Brutschrankaufenthalt wird das Ergebnis abgelesen. Zuvor muß jedoch die Harnstoffunempfindlichkeit der S.gallinarum-Bakterien festgestellt werden. Aus diesem Grund beimpft man jeweils Röhrchen, die mit 1 %-, 5 %-, 10 %- und 15 %iger Harnstofflösung gefüllt sind, mit jungen S.gallinarum-Kulturen.

Das Ergebnis der Versuche über die Harnstoffempfindlichkeit der Gallinarumphagfiltrate ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

Tab. XIII.

a) Filtrat: 260 Stamm

	Harnstoffkonzentrationen			
	1 %	5 %	10 %	15 %
D	+	+	+	+
E	+	+	+	+
Kontrolle: Stamm D ohne Phagfiltrat	-	-	-	-

b) Filtrat: 81 Stamm

	Harnstoffkonzentrationen			
	1 %	5 %	10 %	15 %
D	+	+	+	+
E	+	+	+	+

c) Filtrat: 118 Stamm

	Harnstoffkonzentrationen			
	1 %	5 %	10 %	15 %
E	+	+	+	+
Kontrolle: Stamm E ohne Phagfiltrat	-	-	-	-

d) Filtrat: 143 Stamm

	Harnstoffkonzentrationen			
	1 %	5 %	10 %	15 %
E	+	+	+	+

- Zeichenerklärung: + Klärung der Röhrchen
 - keine Klärung bzw. Trübung der Röhrchen.

Die Röhrchen zeigen trotz Zusatz verschieden starker Harnstofflösungen in allen Fällen vollkommene Klärung; Trübungen weisen nur die Kontrollröhrchen ohne Filtratzusatz auf. Demnach gelingt es nicht, Gallinarumphagen durch Einwirkung von 1 %-, 5 %-, 10 % - und 15 %iger Harnstofflösung zu inaktivieren; die Fähigkeit der Lysis gegenüber S.gallinarum-Stämmen wird unverändert beibehalten.

6. Thermoresistenz der Gallinarumphagen.

Die Angaben über die thermische Resistenz von Bakteriophagen sind sehr unterschiedlich. Im Rahmen der Überprüfung physikalischer Eigenschaften soll auch die thermische Empfindlichkeitsgrenze für Gallinarumphagen ermittelt werden.

Zu diesem Zweck gibt man in 10 sterile Röhrchen jeweils 2 ml Phagfiltrat in der CTC. Die Erhitzung der Phagfiltrate erfolgt für definierte Zeiträume im Wasserbad. Zur Prüfung werden Stamm D und E bzw. nur Stamm E oder analoge Stämme im Plattentestverfahren benützt. Die folgende Tabelle gibt die Versuchsergebnisse über die thermische Empfindlichkeit von Gallinarumphagen wieder.

Tab. XIV.

1ltrat		zum Testen verwendeter S.gallina- rum-Stamm				Höhe der Temperatur in Celsius°							
		60°				65°		70°		75°			
		15	30	45	60	15	30	15	30	15	30		
61													
	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-		
	E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-		
60													
	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-		
	E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-		
81													
	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-		
	E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-		
23													
	E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-		
18													
	E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-		
43													
	E	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-		

Aus der Tabelle geht eindeutig hervor, daß alle geprüften Phagfiltrate bei 65°C innerhalb 30 Minuten keinen Aktivitätsverlust erleiden. Bei Temperaturen von 70°C jedoch werden die Filtrate 261, 260 und 81 (aktiv gegenüber 12₂++ und 12₂[±] S.gallinarum-Stämmen) während der kürzesten geprüften Zeit von 15 Minuten vollkommen inaktiviert. Es ist bemerkenswert, daß es sich hierbei um Filtrate handelt, die 12₂++ und 12₂[±] S.gallinarum-Stämme in gleicher Weise lösen. Größere thermische Toleranz hingegen zeigen die Phagfiltrate 223, 118 und 143 (aktiv nur gegen 12₂[±] S.gallinarum-Stämme). Während Temperaturen von 70°C auf die Dauer von 30 Minuten noch ertragen werden, erleiden die genannten Filtrate jedoch bereits bei 75°C eine totale Einbuße ihrer Aktivität.

7. Inaktivierung der Gallinarumphagen durch Röntgenstrahlen.

In abschließendem Versuch soll noch kurz das Verhalten von Gallinarumphagen gegenüber Röntgenstrahlen dargestellt werden. In die Untersuchungen werden Gallinarumphagen sowohl mit Aktivität gegenüber vollantigenen S.gallinarum-Stämmen und Minusvarianten als auch mit alleiniger Wirkung auf Minusvarianten von S.gallinarum einbezogen.

Die Behandlung der Bakteriophagen mit Röntgenstrahlen wurde mir freundlicherweise im Radiologischen Institut der Universität Freiburg (Direktor: Prof. Dr. L a n g e n d o r f f) ermöglicht, wofür ich besonderen Dank schulde.

Die Phagen werden mit einem Röntgenapparat, C.H.F. Müller M G 150, bestrahlt, der mit 150 kV und 20 mA betrieben wird. Der Strahl wird nicht gefiltert. Die Halbwertschicht beträgt 0,4 mm Cu, der Minutenzufluß 1570 r.

Die Phagsuspensionen werden in kleinen Glaszylindern (2 cm Ø und 1,5 cm Höhe) bestrahlt. Die Flüssigkeitshöhe in jedem Glaszylinder beträgt 5 mm. 4 dieser Glaszylinder finden in einer sterilen Petrischale von 6 cm Durchmesser Aufnahme. Somit können 4 Phagsuspensionen gleichzeitig bestrahlt werden.

Die Phagen werden wie üblich in ihrer kritischen Konzentration (CTC) getestet. Besondere Bedeutung ist dem Nährmedium beizumessen, da die Phaginaktivierung durch Röntgenstrahlen von der Art des Lösungsmittels weitgehend beeinflusst wird. Neben Bouillonfiltraten finden daher Phagsuspensionen, verdünnt in synthetischem Medium, Verwendung.

Bouillon kann bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Phagen als ein schützendes Substrat gelten. Man spricht hier von der direkten Wirkung der Röntgenstrahlen und sieht in der Inaktivierung der Phagen die Folge der Adsorption der Strahlungsenergie innerhalb des Phagenteilchens. Für die folgenden Versuche wird gewöhnliche Bouillon mit pH 7,0 verwendet.

Eine indirekte Wirkung der Röntgenstrahlen auf Phagen kommt dann zustande, wenn die Phagen während der Bestrahlung in einem Medium suspendiert sind, welches durch die Bestrahlung verändert wird und in dieser Eigenschaft auf Phagen schädigend wirkt.

Watson (129) gibt die genaue Zusammensetzung eines synthetischen Lösungsmittels an, das auch in den vorliegenden Versuchen Verwendung findet.

Lösung 1:	KH_2PO_4	2,0 g
	MgSO_4	0,2 g
	NH_4Cl	1,0 g
	anhydriertes Na_2HPO_2	6,0 g
	Aqua dest. ad	900 ml
Lösung 2:	Glukose	4 g
	Aqua dest. ad	100 ml

Die Lösungen 1 und 2 werden getrennt sterilisiert und vor Gebrauch im Verhältnis 9:1 gemischt. Der pH-Wert der Endlösung beträgt 7,0.

Die kritische Konzentration der in Bouillon suspendierten Phagen wird unmittelbar vor der Bestrahlung mit 10^{-6} ermittelt. Die Phagfiltrate werden in der angegebenen Verdünnung gegenüber der Einwirkung von Röntgenstrahlen geprüft. In dieser Form ist es möglich, die direkte Wirkung von Röntgenstrahlen auf Bakteriophagen zu studieren.

Als kritische Konzentration (CTC) wird die Phagverdünnung definiert, die gerade noch im Stande ist, auf der Platte eine totale Lysis hervorzurufen.

Sobald als Verdünnungsmedium eine synthetische Lösung benutzt wird, liegt die CTC wesentlich tiefer als bei Bouillonverdünnung von Bakteriophagen. Die CTC von Gallinarumphagen, die mit synthetischer Lösung verdünnt werden, konnte mit 10^{-2} bis 10^{-1} ermittelt werden. In den genannten Verdünnungen von 10^{-2} bzw. 10^{-1} tritt selbst nach 14-tägiger Konservierung bei 4°C kein Aktivitätsverlust ein.

Die inaktivierende Wirkung der Röntgenstrahlen wird an den Phagfiltraten 260, 261 (aktiv gegenüber 12 ++ und $12_2^{\pm}$ S. gallinarum-Stämmen), 143 und 118 (aktiv gegenüber $12_2^{\pm}$) geprüft. Die Phagen werden in ihrer CTC - sowohl in Bouillon als auch dem oben bezeichneten synthetischen Medium - getestet. Nach einer Röntgeneinstrahlung wird jeweils eine Öse Phagfiltrat aus den einzelnen Zylindern entnommen und im Plattentestverfahren auf Lysefähigkeit untersucht. Auf diese Weise gelingt es, nicht nur die Höhe der Inaktivierungsdosis festzustellen, sondern darüber hinaus kann auch der Einfluß der steigenden Bestrahlungsdosis auf die Phagintensität beobachtet werden.

a) Direkte Wirkung der Röntgenstrahlen auf Gallinarumphagen.

Die direkte Wirkung von Röntgenstrahlen wird an den Gallinarumphagen 260, 261, 143 und 118 überprüft. Alle Filtrate stehen in einer Bouillonverdünnung von 10^{-6} , d.h. in ihrer CTC, zur Verfügung. Die initiale Strahlendosis liegt in allen Fällen bei 10 000 r. Sie wird in den weiteren Versuchen jeweils um 10 000 r erhöht, bis die phaginaktivierende Dosis erreicht ist. Aus den nachfolgenden Versuchsgruppen geht hervor, daß dabei die Phagaktivität mit steigender Strahlendosis abnimmt.

Tab. XV.

Filtrate
Verdünnung 10^{-6}
(in Bouillon)

Röntgenzahl in r:

	10000	50000	100000	370000	400000	510000	580000
260	+++	+++	++/+++	++/+++	+	-	-
261	+++	+++	++/+++	++/+++	+	-	-
143	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	+	-
118	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	+	-

Die Phagfiltrate 260 und 261 erweisen sich einer direkten Wirkung von Röntgenstrahlen gegenüber empfindlicher, als dies für die Gallinarumphagen 143 und 118 zutrifft.

Die Phagen 260 und 261 zeigen nach einer Einwirkung von 100000 r auf der Platte im Bereich der Impfstelle schon eine deutliche Abschwächung in Form einer partiellen Lysis (p.L.). Nach 400000 r führen die genannten Filtrate nur noch zur Plaquesbildung. Mit zunehmender Strahlendosis verringert sich auch die Zahl der gebildeten Plaques. Eine Röntgendosis von 510 000 r inaktiviert die Filtrate 260 und 261 vollständig.

Die Filtrate 143 und 118 hingegen zeigen erst bei 370 000 r verminderte Aktivität (p.L.) und werden erst nach Einwirkung von 580 000 r inaktiv.

b) Die indirekte Wirkung von Röntgenstrahlen auf Gallinarumphagen.

Die indirekte Wirkung von Röntgenstrahlen auf Phagen wird mit Hilfe des bereits näher bezeichneten synthetischen Mediums durchgeführt.

Die Phagen 260 und 261 zeigen bei einer Verdünnung von 10^{-2} in syntheti-

schem Medium noch nach 14 Tagen bei 4°C volle Wirksamkeit. Demgegenüber werden die Phagfiltrate 143 und 118 in derselben Verdünnung schon innerhalb 24 Stunden bei 4°C inaktiv. Die Gebrauchsverdünnung der Filtrate 260 und 261 liegt demnach bei einer Verdünnung von 10^{-2} , die der Filtrate 143 und 118 bei 10^{-1} .

Zur Erzielung vergleichbarer Ergebnisse wurde als experimentelle Basis bei allen Filtraten eine Verdünnung von 10^{-1} benützt.

Für die nachstehende Versuchsanordnung werden Röntgendosen zwischen 10000 und 500000 r ausgestrahlt. Innerhalb des genannten Strahlenbereichs ergeben sich für die einzelnen Phagfiltrate folgende Inaktivierungsdosen:

Tab. XVI.

Filtrat (Verdünnung 10^{-1} in synth. Medium)	Röntgenzahl in r.					
	10000	140000	190000	250000	290000	440000
260	+++	++/+++	-	-	-	-
261	+++	++/+++	-	-	-	-
143	+++	+++	+++	++/+++	-	-
118	+++	+++	+++	++/+++	++	-

Die Phagen 260 und 261 werden in einer Verdünnung von 10^{-1} in synthetischem Medium schon bei 140000 r offensichtlich in ihrer Aktivität geschwächt. Eine Einstrahlungsdosis von 190000 r inaktiviert die Phagen dann vollständig.

Wesentlich widerstandsfähiger erweisen sich die Filtrate 143 und 118. Die inaktivierende Strahlendosis liegt für Filtrat 143 bei 290000 r, für Filtrat 118 bei 440000 r.

Unabhängig von diesen Untersuchungen wurde die indirekte Wirkung von Röntgenstrahlen speziell auf die Filtrate 260 und 261 bei einer Verdünnung von 10^{-2} in synthetischem Medium weiterhin untersucht. In dieser Konzentration erleiden die bezeichneten Filtrate bereits bei einer Strahlendosis von 30000 r eine Verminderung der Aktivität. Bei einer Röntgendosis von 40000 r tritt eine völlige Inaktivierung ein.

Dieser Versuch beweist evident, daß der Verdünnungsgrad von Gallinarumphagen sich zur Strahlendosis umgekehrt proportional verhält. Die Filtrate 260 und 261 werden also bei einer Verdünnung von 10^{-2} in synthetischem Medium von geringeren Röntgendosen inaktiviert, als dies bei einem nur 10^{-1} verdünnten Filtrat möglich ist.

Als verantwortlicher Faktor für diese unterschiedliche Strahlenresistenz kann der verschiedenartige Gehalt des synthetischen Mediums an Bouillon gelten.

Da das Ausgangsfiltrat eine Bouillönsuspension darstellt, enthält jede Verdünnung von 10^{-1} noch 10 % Bouillon, eine Verdünnung von 10^{-2} nur noch 1 % Bouillon. Die schützende Funktion von Bouillon bei der direkten Wirkung von Röntgenstrahlen erklärt die unterschiedliche Strahlenresistenz weitgehend.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Als erstes Ziel der vorliegenden Arbeit galt die Isolierung von Bakteriophagen mit spezifischer Aktivität gegenüber *S. gallinarum* (pullorum).

Zu diesem Zweck wurden zunächst 160 Hühnerkotproben auf das Vorkommen von spezifischen Gallinarumphagen geprüft. Dabei zeigte sich Hühnerkot als ergiebiges Reservoir für die Gewinnung von Gallinarumphagen. In 106 untersuchten Hühnerkotproben (= 66 %) konnten spezifische Phagen nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden auf 3 Kotproben von Rindern und 9 Ileocaecalklappen und Tonsillen von Schweinen ausgedehnt. Aus insgesamt 12 Proben war es möglich, 2 mal Phagen zu isolieren. Außerdem erstreckte sich die Untersuchung auf den Darminhalt von 6 Mäusen, die 10 Tage lang mit Kultur von *S. gallinarum* gefüttert worden waren. Hier konnten in allen Fällen Gallinarumphagen nachgewiesen werden.

Die Tatsache, daß Bakterienstämme Träger latenter Phagen sein können, wurde auch im Rahmen dieser Untersuchungen berücksichtigt. Bei speziellen Prüfungen ließ sich bei *S. gallinarum*-Stamm G ein latenter Phage nachweisen. Mit Hilfe einiger Bouillonpassagen gelang es auch, diesen Prophagen in seine aktive Form überzuführen.

Als Ergebnis des ersten Untersuchungsabschnittes kann festgestellt werden, daß Hühnerkot als Reservoir für Gallinarumphagen gelten kann. Aber auch aus Material anderer Herkunft, wie Rinderkot, Ileocaecalklappen und Tonsillen von Schweinen und Darminhalt von Mäusen, ist es möglich, gallinarumaktive Phagen zu gewinnen.

Der zweite Abschnitt der Untersuchung sollte klären, ob eine Typisierung von *S. gallinarum* mit Hilfe von Phagen möglich ist. Die Grundlage für die Phagotypisierung bildete die Einteilung von *S. gallinarum* in Serotypen, wie sie von Edwards und Bruner (49), ferner von Rots (95) in vollantigene Stämme (12_2^{++}) und Minusvarianten ($12_2^{\pm}$) vorgenommen wurde.

Im Rahmen vorliegender Untersuchungen wurden frisch isolierte Phagfiltrate an 29 Stämmen von *S. gallinarum* auf Aktivität geprüft. 21 Teststämme waren vollantigene Stämme, die übrigen 8 dagegen Minusvarianten.

Die isolierten Gallinarumphagen konnten, gemessen an ihrer Spezifität, in 2 Gruppen eingeteilt werden:

1. 82 Phagfiltrate, die gegenüber allen *S.gallinarum*-Stämmen Aktivität zeigten,
2. 33 Phagfiltrate, die nur gegenüber den Minusvarianten von *S.gallinarum* aktiv waren.

Der Nachweis von Phagen mit ausschließlicher Aktivität gegenüber vollantigenen Stämmen (122++) war bisher nicht möglich. Auch der Versuch, Gallinarumphagen durch Passage an vollantigene Stämme zu adaptieren, mißlang bisher in allen Versuchsreihen. Selbst nach 24 Passagen waren die fraglichen Filtrate nach wie vor sowohl gegen vollantigene Stämme, als auch gegenüber Minusvarianten von *S.gallinarum* aktiv. Auch *S.gallinarum*-aktive Phagen anderweitiger Herkunft (Rinderkot, Ileocaecalkappen und Tonsillen von Schweinen und Darminhalt von Mäusen) ließen sich durch Passagen an vollantigene Stämme nicht adaptieren.

Weiterhin wurden die Gallinarumphagen im Kreuzungstest an anderen Bakterienarten auf Spezifität geprüft. Dabei zeigte sich, daß von 12 Filtraten 10 auch gegenüber *S.typhi-murium* Aktivität zeigten, während alle anderen Bakterienstämme verschiedenster Gattungen keine Lyseerscheinungen aufwiesen.

Als Maß für die Aktivität der Phagen gilt die Bestimmung der kritischen Konzentration (CTC), also derjenigen Phagverdünnung, die gerade noch in der Lage ist, auf der Platte eine totale Lysis hervorzurufen. Sie liegt bei den durch Bouillonpassagen angereicherten Gallinarumphagen bei 10^{-6} bis 10^{-7} .

Im dritten Abschnitt der Untersuchungen wurde schließlich die Resistenz der isolierten Phagen gegenüber chemisch-physikalischen Einwirkungen verschiedener Art getestet.

Dem photodynamischen Effekt von Methylenblau gegenüber erweisen sich die Gallinarumphagen relativ resistent. Es wird ihr Verhalten bei Einwirkung von 1:20000, 1:10000, 1:5000 und 1:1000 verdünnter, wässriger Methylenblaulösung geprüft. In niederen Verdünnungen ist selbst nach Einwirkung starker Methylenblaukonzentrationen und bei langer Einwirkungszeit keine Abnahme der Lysefähigkeit festzustellen. Bei höheren Phagverdünnungen jedoch zeigt

sich eine Aktivitätsminderung bzw. eine Inaktivierung der Phagen, die von der Höhe der verwendeten Methylenblaukonzentration und der Einwirkungszeit abhängig ist.

Im pH-Bereich von 4,0 bis 10,0 sind Gallinarumphagen ohne Einschränkung wirksam. Sie zeigen jedoch bei pH 4,0, 4,5 und 10,0 eine gewisse Aktivitätsschwächung. Phagsuspensionen, die 36 Stunden bei 4,0, 4,5 oder 10,0 gehalten werden, sind nur noch zu partieller Lysis oder Plaquesbildung fähig.

Die Inaktivierung von Phagen durch Formalin stellt eine Proteininaktivierung dar. Auch Gallinarumphagen erweisen sich gegen Formalineinwirkung empfindlich. Die Einwirkung von 0,33 %iger Formalinlösung während 10 Minuten inaktiviert Gallinarumphagen vollkommen.

Die Gallinarumphagen behalten bei 1 %-, 5 %-, 10 %- und 15 %igem Zitratzusatz zum Nährboden ihre Lysebefähigung bei. Wohl zeigt sich eine gewisse Aktivitätsschwächung, die jedoch nur diejenigen Phagfiltrate betrifft, die sowohl Minusvarianten als auch vollantigene Stämme von *S.gallinarum* zu lösen vermögen. Gallinarumphagen, die nur Minusvarianten angreifen, zeigen auch bei Anwesenheit von 15 % Natriumzitrat keine Aktivitätseinbuße. Demnach sind Gallinarumphagen der Gruppe der zitratunempfindlichen Phagen zuzuordnen.

Volle Aktivität behalten alle isolierten Gallinarumphagen bei, wenn dem Nährmedium Harnstoff in einer Konzentration zwischen 1 und 15 % zugesetzt wird.

Unterschiedliche Resistenz gegenüber Einwirkung von höheren Temperaturen weisen die beiden Gallinarum-Phaggruppen auf. Diejenigen Gallinarumphagen, die nur die Minusvarianten (12_2^+) von *S.gallinarum* zu lösen vermögen, sind widerstandsfähiger als Phagen, die sowohl die vollantigenen Stämme (12_2^{++}) als auch die Minusvarianten (12_2^+) angreifen. Die Temperaturgrenze für Gallinarumphagen beträgt 65°C . Diejenigen Phagen, die nur die Minusvarianten angreifen, können Temperaturen von 70°C während 30 Minuten vertragen. Phagen, die alle *S.gallinarum*-Stämme - also die Minusvarianten und die vollantigenen Stämme - lösen, zeigen bei dieser Temperatur keine Aktivität mehr.

Bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen ist die Inaktivierungsdosis r für Gallinarumphagen, die nur die Minusvarianten angreifen, sowohl bei

Suspension der Phagen in Bouillon als auch in synthetischem Medium wesentlich höher als die Inaktivierungsdosis bei denjenigen Phagen, die alle *S.gallinarum*-Stämme zu lösen vermögen. So benötigen in Bouillon suspendierte Phagen, die nur 12_2^+ *S.gallinarum*-Stämme lösen, 580000 r zur Inaktivierung, während diejenigen Gallinarumphagen mit Lysis sowohl gegen 12_2^{++} als auch 12_2^+ *S.gallinarum*-Stämme schon bei etwas geringeren Röntgendosen von 510000 r inaktiv werden. Bei den 1:10 in synthetischem Medium verdünnten Phagen liegt die Röntgeninaktivierungsdosis für Phagen, die Minusvarianten und vollantigene *S.gallinarum*-Stämme lösen, bei 190000 r, während die Gallinarumphagen, die nur Minusvarianten angreifen, Röntgendosen von 290000 bzw. 440000 r zu ihrer Inaktivierung benötigen.

Als wichtigstes Ergebnis der Untersuchungen kann die Isolierung von Gallinarumphagen gelten, die in spezifischer Weise gegenüber 12_2^+ *S.gallinarum*-Stämmen (Minusvarianten) Aktivität zeigen. Durch die Existenz derartiger Phagen erscheint eine sichere Phagtypisierung von 12_2^+ und 12_2^{++} *S.gallinarum*-Stämmen möglich. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß sich die isolierten spezifischen Gallinarumphagen mit Aktivität gegenüber 12_2^+ *S.gallinarum*-Stämmen auch in anderen Eigenschaften von den übrigen Gallinarumphagen unterscheiden. Dies konnte in einer erhöhten Resistenz gegenüber der Einwirkung von Wärme und Röntgenstrahlen deutlich gemacht werden.

V. Zusammenfassung .

1. 160 Hühnerkotproben wurden auf ihren Gehalt an aktiven Gallinarumphagen untersucht.
2. Aus 106 Hühnerkotproben (= 66 %) konnten aktive Gallinarumphagen isoliert werden.
3. Aus 3 Rinderkotproben sowie 9 Tonsillen und Ileocaecalklappen von Schweinen wurde jeweils 1 gallinarum-aktiver Phage isoliert.
4. Aus dem Darminhalt von 6 Mäusen, die auf die Dauer von 10 Tagen mit Kulturen von *S. gallinarum* gefüttert wurden, ließen sich in allen Fällen Gallinarumphagen isolieren.
5. Von 115 Gallinarumphagen zeigten 33 spezifische Aktivität gegen $12_2^{\pm}$ *S. gallinarum*-Stämme (Minusvarianten). 82 Phagpräparationen erwiesen sich sowohl gegen vollantigene Stämme als auch gegen Minusvarianten von *S. gallinarum* in gleicher Weise aktiv.
6. Gallinarumphagen mit spezifischer Aktivität gegenüber vollantigenen Stämmen wurden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht ermittelt.
7. Durch Bouillonpassagen gelang es, Gallinarumphagen zu aktivieren.
8. Die kritische Konzentration (CTC) der isolierten Gallinarumphagen wurde bei einer Verdünnung von 10^{-6} ermittelt.
9. Methylenblaukonzentrationen von 1:20000, 1:10000, 1:5000 und 1:1000 können Phagen in ihrer Aktivität beeinflussen.
10. Gallinarumphagen sind ohne Unterschied formalinempfindlich.
11. Gegenüber Harnstoff und Zitrat wird keine nennenswerte Empfindlichkeit beobachtet.
12. Die isolierten Gallinarumphagen zeigen in einer pH-Spanne zwischen 4,0 und 10,0 fast uneingeschränkte Aktivität.
13. Die thermische Empfindlichkeitsgrenze liegt bei Gallinarumphagen mit spezifischer Aktivität gegen Minusvarianten von *S. gallinarum* bei 70° C. Gallinarumphagen mit gleichzeitiger Wirksamkeit gegenüber

vollantigenen Stämmen und Minusvarianten werden bereits bei 65 ° C inaktiv.

14. Gallinarumphagen zeigen unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen. Dabei benötigen in Bouillon befindliche Gallinarumphagen höhere Strahlendosen als Gallinarumphagen, die in synthetischem Medium suspendiert sind. Die Strahlenwerte liegen bei in Bouillon suspendierten Phagen zwischen 510000 und 580000 r. Die Inaktivierungsdosen bei Gallinarumphagen, die in synthetischem Medium suspendiert sind, liegen zwischen 190000 und 440000 r.

VI. Literaturverzeichnis.

1. Anderson, T.F.: Ref. nach Delbrück. Über Bakteriophagen. Die Naturwissenschaften, 34, 301, 1947.
2. Almon, L.,
Stovall, W.D.: Amer. Journ. publ. Health 1937, 357, zitiert nach H. Schmidt, Grundlagen der spez. Therapie Kap. Typhus S. 357, Verlag Bruno Schultz 1943.
3. Arnold, L.,
Weiss, E.: The Twort-d'Hérelle phenomenon. The resamblance of bacteriophag to toxin and ferments. Journ. of infect. dis. 35, 603, 1924.
4. Asheshov, J. -N.: Action au citrate de soude sur le bactériophage. Cpt. rend. des Sēances de la soc. de biol. 94, 687, 1926.
5. Bail, O.: Bakteriophage Wirkung gegen Flexner- und Coli-Bakterien. Wien. kl. Wschr. 1921, 448.
6. Beard, B. -J.: Decreased resistance of purified bacteriophages to disinfectants. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 26, 880, 1929.
7. Beckwith, T.D.,
Olson, A.R.,
Rose, E.J.: The effect of x-ray upon bacteriophage and upon bacterial organism. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 27, 285, 1930.
8. Beganović, A.H.: Einige Beobachtungen über die Wirkung von Bakteriophagen auf S. pullorum. Veterinarski Arhiv, Zagreb, Jugoslawien. 1951, 421.
Ref. W. t. M. 41, 176, 1954.
9. Beganović, A.H.;
Topolnik, E.: Diagnostik und Differenzierung von S. pullorum und S. gallinarum mittels Bakteriophagen. Veterinarski Arhiv, Zagreb, Jugoslawien. 1951, 548, Ref. W. t. M. 41, 177, 1954.
10. Billaudelle, H.: Spezifität und Wirkungsweise der Bakteriophagen. Zentr. f. Bakter. Origin. I. 157, 123, 1951/52.

11. Billaudelle, H.: Über die Spezifität und Wirkungsweise der
Bakteriophagen.
Z.f.Immunitätsf. Orig.CIX, 103, 1952.
12. Bronfenbrenner, J.: The heat inactivation of bacteriophages.
Proc.Soc.exper.Biol.a.Med. 29, 802, 1932.
13. Bronfenbrenner, J., Effect of urea upon activity of bacteriophage.
Heller, D.M.: Proc.Soc.exper.Biol.a.Med.30, 1309, 1933.
14. Bronfenbrenner, J., Effect of alcohol on the so-called bacteriophage
Korb, Ch.: of d'Hérelle.
Proc.Soc.exper.Biol.a.Med.21, 177, 1924.
15. Bronfenbrenner, J., Studies on the bacteriophage of d'Hérelle.
Korb, Ch.: II. Effect of alcohol on the bacteriophage of
d'Hérelle.
J.of exper. Med. 12, 419, 1925.
16. Bronfenbrenner, J., On the nature of inactivation of the bacteriophage
Korb, Ch.: by alcohol.
Proc.Soc.exper.Biol.a.Med. 23, 5, 1925.
17. Brandis, H.: Über einen Paratyphus B-Stamm mit atypischem
Verhalten bei der Phagentypisierung.
Z.f.Hyg. 138, 296, 1953.
18. Brandis, H.: Über die Beeinflussung des Reaktionsbildes bei
der Lysotypie von Paratyphus B-Stämmen durch
einen Paratyphus B-Phagen.
Z.f.Hyg. 142, 197, 1955.
19. Brandis, H.: Zur Unterteilung des Typhusbakterientyps E₁.
Z.f.Bakt.Orig.I. 162, 223, 1955.
20. Brandis, H.: Die Lysotypie mit Typhus- und Paratyphus
B-Stämmen von Dauerausscheidern.
Z.f.Bakt.Orig.I. 162, 437, 1955.
21. Brandis, H.: Die Lysotypie von Typhus- und Paratyphus
B-Bakterien.
Z.f.Bakt.Orig.I. 164, 149, 1955.

31. Clauberg, K.W.,
Marcuse, K.: Über die Bakteriophagendiagnostik als Hilfsmittel
für die Typendifferenzierung innerhalb der Ruhr-
bazillen.
Zentr.f.Bakt. Orig.I. 124, 29, 1932.
32. Clifton, C.E.: Photodynamic action of certain dyes on the
inactivation of staphylococcus-bacteriophage.
Proc.Soc.exper.Biol.a.Med. 28, 745, 1931.
33. Clifton, C.E.,
Lawler, T.G.: Inactivation of staphylococcus-bacteriophage by
toluidin blue.
Proc.Soc.exper.Biol.a.Med. 27, 1041, 1930.
34. Colwell, Ch.A.: Inactivation of bacteriophage by ethyl-alcohol.
Proc.Soc.exper.Biol.a.Med. 36, 760, 1937.
35. Cohen, S.S.: Bacter.Rev. 15, 31, 1951. Zusammenfassung.
Auszug aus: Schramm, G.: Chemie der Viren.
Verhandlg.der Gesellsch.deutscher Naturf.u.
Ärzte, 1953, S. 61.
36. Craigie, J.,
Brandon, K.F.: The laboratory identification of the V-form of
B.typhosus.Canad.Journ.publ.Health 1936, 165.
37. Craigie, J.,
Yen, C.H.: The demonstration of types of bacterium typhosus
by means of preparations of Type II. -V. phage.
The stability and epidemiological significance
of V-form typs of B.typhosus.
Canad.Journ.publ.Health. 1938, 484.
38. Da Costa Cruz, J.: Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration
auf den d'Hérelle'schen Bakteriophagen.
Brazil.-med. 1, 50, 1924.
39. Delbrück, M.: Über Bakteriophagen. Die Naturwissenschaften.
34, 301, 1947.
40. Delbrück, M.: Die gegenwärtigen Ansichten über die Vermeh-
rung von Bakteriophagen.
Naturw.Rundsch. 1954, 253.
41. D'Hérelle, F.: Sur le microbe bactériophage.
Zentr.f.Bakt.Ref. 72, 412, 1921.

42. D'Hérelle, F.: Der Bakteriophage und seine Bedeutung für die Immunität.
Verlag Vieweg und Sohn, Braunschweig 1922.
43. D'Hérelle, F.,
Sertic, V.: Formation par adaption des races de bactériophages. Thermoresistances.
C. r. Soc. Biol. Paris 104, 1256, 1930.
44. Doerr, R.,
Berger, W.: Studien zum Bakteriophagenproblem.
III. Mitteilung. Die antagonistische Wirkung von Gelatine und Agar auf den Ablauf der Bakteriophagenreaktion.
Z. f. Hyg. 97, 422, 1923.
45. Doerr, R.,
Grüniger, W.: Studien zum Bakteriophagenproblem.
1. Mitteilung. Zeitliche und quantitative Beziehungen zwischen Bakterienvermehrung und Zunahme des lytischen Agens.
Z. f. Hyg. 97, 209, 1923.
46. Doerr, R.,
Rose, G.: Die Thermoresistenz der übertragbaren Lysine (Bakteriophagen).
Schweiz. med. Wschr. 1924, 10.
47. Drozevina, M.: Die Bakteriophagenprobe als Identifizierungsmethode für nicht-spezifische Brucellosekulturen.
Zentr. f. Bakt. Ref. 154, 559, 1954.
48. Edlinger, E.: Die Lysotypie der Salmonella typhi und paratyphi β .
Wien. klin. Wschr. 64, 343, 1952.
49. Edwards, P. R.,
Bruner, D. W.: Form variation in Salmonella pullorum and its relation to X-strains.
Cornell Veterinarian, Vol. XXXVI, No. 4 Oct. 1946.
50. Felix, A.,
Callow, B.: Brit. med. J. 2, 1943, 127.
Zit. nach Edlinger, E.
51. Felix, A.,
Callow, B.: Lancet. 261, 10, 1951.
Zit. nach Edlinger, E.

52. Felix, A.,
Pitt, R.M.: A new antigen of *B. typhosus*; its relation to virulence and to active and passive immunisation. *Lancet* 1934, II, 186.
53. Freytag, Bl.,
Plochmann, E.: Erfahrungen mit der Lysotypie bei der Typhusdiagnose.
Z.f.Hyg. 142, 188, 1955.
54. Frisbee, F.C.,
Mac Neal, W.J.: The behaviour of *Esch. coli* and its specific bacteriophage in urine. The influence of environmental factors.
Journ. of infect. dis. 46, 405, 1930.
55. Fursenko, B.,
Dmitrieff, K.,
Schostak, K.: Untersuchungen therapeutischer Eigenschaften des Bakteriophagen in bezug auf Infektionen, die bei Küken durch *Salmonella pullorum* und *gallinarum* hervorgerufen werden.
Wiss. Annalen d. Veterinärinst. Kiew 1. H. 1. 59 (1938).
Zentr.f.Bakt.Ref. 139, 470, 1941.
56. Goebel, W.F.,
Jesaitis, M.A.: Chemical and antiviral properties of the somatic antigens of phase II "*S. sonnei*" and of a phageresistant variant II, 3, 4, 7.
Ann. Inst. Pasteur 84, 66, 1953.
57. Gratia, A.: Variations du *B. coli* et hétérogénéité des principes lytiques correspondants.
Ann. Inst. Pasteur 50, 306, 1933.
58. Grigorieff, A.,
Wollman, E.: Sur le mode de l'inactivation des bactériophages.
C. r. Soc. de Biol. 96, 1141, 1927.
59. Güller, W.: Verhalten verschiedener Bakteriophagen gegenüber chemischen und physikalischen Einwirkungen.
Z.f. Immunitätsforsch. 86, 248, 1935.
60. Haardick, H.: Die Sichtbarmachung der Bakteriophagenreaktion im Elektronenmikroskop.
Z.f.Hyg. 130, 428, 1950.
61. Hammer, D.: Gewinnung und Eigenschaften der Bakteriophagen des Rotlaufbacteriums.
Vet. med. Inaug. Diss. München 1951.

62. Hauduroy, P.: Action de la bile sur le bactériophage et importance de cette action.
Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 92, 1442, 1925.
63. Heiberg, B.: Die Thermoresistenz bei jungen und alten Bakterien und jungen und alten Bakteriophagen.
Z.f. Hyg. 114, 425, 1932.
64. Heicken, K., Spicher, G.: Über die Kinetik der Inaktivierung und Reaktivierung von Phagen.
Zentr.f. Bakt. Orig. I. 167, 97, 1956.
65. Hoder, F., Heller, L.: Beitrag zur Diagnose von Paratyphus B mittels Bakteriophagen.
Münch. med. Wschr. 12, 489, 1929.
66. Hoder, F., Ino, S.: Über den Bakteriophagengehalt der Hühnerorgane und des Hühnerdarmtraktes.
Münch. med. Wschr. 1929, 213.
67. Jadin, J.: Le pouvoir d'adaption d'un bactériophage à la chaleur.
C. r. Soc. Biol. 122, 470, 1936.
68. Kauffmann, F.: The Diagnosis of Salmonella Types.
Springfield Illinois 1950.
69. Krueger, A. P., Baldwin, D. M.: The reversibel inactivation of bacteriophage by bichloride of mercury.
J. gen. Physiol. 17, 499, 1934.
70. Lominski, J.: Inactivation du bactériophage par oxydation.
C. r. Soc. Biol. 119, 952, 1935.
71. Lominski, J.: Inactivation du bactériophage par oxydation.
C. r. Soc. Biol. 122, 766, 1936.
72. Luria, S. E.: Reactivation of irradiated bacteriophage by transfer of self-reproducing units.
Proc. Nat. Acad. Sci. 33, 253, 1947.
73. Luria, S. E.: In Natur of Virus Multiplication. S. 99.

74. Luria, S. E.,
Exner, F. M.:
The inactivation of bacteriophages by
x-rays-influence of the medium,
Proc. Nat. Acad. Sci. 27, 370, 1941.
75. Lwoff, A.:
L'induction.
Ann. Inst. Pasteur 84, 225, 1953.
76. Marcuse, K.:
Untersuchungen über das d'Hérelle'sche Phäno-
men. III. Mitteilung. Beziehungen zwischen
Bakteriophagie und Agglutination.
Z. f. Hyg. 105, 17, 1926.
77. Marcuse, K.:
Untersuchungen über das d'Hérelle'sche Phäno-
men. IV. Mitteilung. Studien über die Struktur-
analyse bei Lysinen.
Z. f. Hyg. 107, 563, 1927.
78. Marcuse, K.:
Zur Bakteriophagen-Diagnostik der E-Ruhr.
Klin. Wschr. X, 732, 1931.
79. Marcuse, K.:
Über Typhusdiagnostik mit spezifischen Bakterio-
phagen (nach Sonnenschein).
Zentr. f. Bakt. Orig. I. 131, 206, 1931.
80. Marcuse, K.:
Über Phagendiagnostik innerhalb der Para-
typhusgruppe.
Zentr. f. Bakt. Orig. I. 1931, 49, 1934.
81. Miessner, H.,
Baars, G.:
Bakteriolysate und das Phänomen von d'Hérelle.
Dtsch. tierärztl. Wschr. XXX, 207, 1922.
82. Moriyama, H.,
Ôhashi, Sh.:
The mode of action of formaldehyd upon phage
proteid.
Arch. f. d. gesamte Virusforschg. I, 252, 1940.
83. Nakamura, O.:
Das Verhalten von Bakteriophagen in Gelatine.
Wien. klin. Wschr. 1923, 80.
84. Necker, de:
De l'influence de la chaleur sur le principe
bactériophage.
C. r. Soc. Biol. 86, 736, 1922.

85. Ôhashi, Sh.: The mode of action of Sublimate upon Phage Protein.
Arch.f.d.gesamte Virusforschg. 2, 205, 1943.
86. Otto, R.,
Munter, H.: Bakteriophagie.
W.Weichardt:Ergebnisse der Hygiene 6, 1, 1924.
87. Otto, R.,
Winkler, W.F.: Über die Natur des d'Hérelle'schen Bakteriophagen.
D.med.Wschr.1922, 383.
88. Perdrau, J.R.,
Todd, Ch.: The photodynamic action of methylen blue on bacteriophage.
Proc.roy.Soc.London.Ser.B.Biol.Sci.112, 277, 1933.
89. Perdrau, J.R.,
Todd, Ch.: The photodynamic action of methylen blue on certain viruses.
Proc.roy.Soc.London.Ser.B.Biol.Sci.
112, 288, 1933.
90. Pöhn, H.Ph.: Die Differenzierung von Staphylococcus aureus mittels Bakteriophagen.
Zentr.f.Bakt.Orig.I. 164, 164, 1955.
91. Proca, G.: Sur la résistance du principe lytique (bactériophage) au bichlorure de mercure.
C.r.Soc.Biol.96, 1244, 1927.
92. Raettig, H.: Experimentelle Untersuchungen über Entwicklungsvorgänge bei Bakteriophagen. 1. Mitteilung: Die Ausgangsbeobachtung und ihre technischen Voraussetzungen.
Zentr.f.Bakt.Orig.I 157, 287, 1951/52.
93. Rische, H.,
Rohne, H.,
Schneider, H.: Ergebnisse der Vi-Phagen-Typisierung von Salm. typhi und paratyphi B.
Z.inn.Med.9, 896, 1954.
94. Rolle, M.: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre.
Ferd.Enke, Stuttgart 1949, 152.

95. Roots, E.: Serologische Variationen bei *Salm. gallinarum* (*S. pullorum*) und ihre Bedeutung für die Sero-diagnostik der weißen Kükenruhr.
Berl. und Münch. tierärztl. Wschr. 1952, 108.
96. Ross, A.F.,
Stanley, W.M.: Proc. Soc. exper. Biol. Med. 38, 260, 1938.
Zit.: Heicken, K. und G. Spicher.
97. Sartorius, F.,
Reploh, H.: Neue Ergebnisse bei der Differenzierung der Ruhrtypen.
Zentr.f. Bakt. Orig. I. 122, 135, 1931.
98. Sartorius, F.,
Reploh, H.: Über die weitere Entwicklung der Ruhrassenfor-schung insbesondere in der Pseudodysenterie - resp. Flexnergruppe.
Zentr.f. Bakt. Orig. I. 126, 10, 1932.
99. Scheidegger, E.: Studien zum Bakteriophagenproblem.
IV. Mitteilung. Der Einfluß der Wasserstoffionen-konzentration auf das lytische Agens und den Ablauf der übertragbaren Bakteriolyse.
Z.f. Hyg. 99, 403, 1923.
100. Schmid, A.: Gewinnung spezifisch eingestellter Diagnostik-
phagen durch Umzüchtung.
Zentr.f. Bakt. Orig. I. 123, 202, 1932.
101. Schmid, A.: Über die Verwendung des Bakteriophagen in der
Typhus-Paratyphusdiagnose.
Zentr.f. Bakt. Orig. I. 123, 207, 1932.
102. Scholtens, R. Th.: The resistance developed against bacteriophage.
J. of Hyg. 36, 452, 1936.
103. Schultz, E. W.,
Gebhardt, L. P.: Nature of formalin inactivation of bacteriophage.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 32, 1111, 1935.
104. Schultz, E. W.,
Krueger, A. P.: Inactivation of staphylococcus bacteriophage by
methylen blue.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 26, 100, 1928.
105. Seiffert, W.: Das d'Hérelle'sche Phänomen als exogene Auto-
lyse der Bakterien.
Z.f. Hyg. 98, 482, 1922.

106. Seiffert, G.: Virus und Viruskrankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen. IV. Teil Bakteriophagen. Verlag Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig 1938, 193.
107. Sertic, V.: Sur les races de bactériophages virulents pour les streptocoques.
C. r. Soc. Biol. 102, 982, 1924.
108. Sertic, V.,
Boulgakow, N. -A.: Sur la sensibilité des souches d'Eberthella typhi au bactériophage, en relation avec les caractères antigéniques.
C. r. Soc. Biol. 122, 35, 1936.
109. Sharp, D. G.,
Hock, A.,
Taylor, A. H.,
Beard, D.,
Beard, I. W.: Sedimentation characters and pH-stability of T₂ bacteriophage of Escherichia coli.
Journ. Biol. Chem. 165, 1, 259, 1946.
110. Shwartzman, G.: The influence of partial inactivation upon the potency of the bacteriophage.
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 22, 324, 1925.
111. Shwartzman, G.: The rate of reduction of methylen blue by Bacillus coli in the course of the Bacteriophage phenomenon.
Zentr. f. Bakt. Orig. I. 101, 62, 1927.
112. Sierakowski, S.,
Zublidowsky, F.: Le pH limite des bactériophages.
C. r. Soc. Biol. 103, 422, 1930.
113. Sievers, M.: Ein neuer Salmonellatyp "Köln" durch Phagen-diagnostik ermittelt.
Zentr. f. Bakt. Orig. I. 150, 52, 1943.
114. Sonnenschein, K.: Die Verwendbarkeit der Bakteriophagie für die bakteriologische Diagnose.
Münch. med. Wschr. 72, 1443, 1925.
115. Sonnenschein, K.: Wirkung von Bakteriophagen auf Typhusbakterien.
Münch. med. Wschr. 76, 355, 1929.

116. Sonnenschein, K.: Auf Leucht vibrionen wirksame Bakteriophagen.
Zentr.f.Bakt. Orig.I. 126, 297, 1932.
117. Spalatin, J.: Über Vorkommen und Herkunft der
Bakteriophagen bei Hühnern.
Zentr.f.Bakt. Orig.I. 151, 25, 1944/45.
118. Spalatin, J.: Größenbestimmung der Bakteriophagen
durch Ultrafiltration.
Zentr.f.Bakt. Orig.I. 151, 390, 1944/45.
119. Standfuß, R.,
Lehr, E.: Zur Erkennung und Unterscheidung der Keime
der Paratyphus-Enteritis-Gruppe.
Berl. tierärztl. Wschr. 44, 533, 1928.
120. Stassano, H.,
de Beaufort, A.C.: Action du citrate de soude sur le principe
lytique transmissible.
C.r. Soc. Biol. 93, 1380, 1925.
121. Strack, W.: Das biologische Verhalten einiger Pullorum-
stämmen, die das Teilantigen XII₂ nicht oder
nur in geringer Menge besitzen.
Vet. med. Inaug. Diss. Gießen 1952.
122. Teveli: Bazilläre Diagnose des Typhus abdomina-
lis mittels Bakteriophagen.
Jb. Kinderheilkunde 1931, 130.
123. Thumes, M.: Vergleichende Untersuchungen über die Ein-
wirkung von Bakteriophagen des Hühnerdarms
auf *Bacterium gallinarum* (Klein) und *Bacte-
rium pullorum* (Rettger).
Vet. med. Inaug. Diss. Leipzig 1933.
124. Toyoda, M.: Verwendung eines Dysenteriebakteriophagen
in der bakteriologischen Diagnostik.
D. med. Wschr. 57, 451, 1931.
125. Twort, F.W.: The breaking down of bacteria by associated
filter passing lysins. (19. Jahresversammlung
d. Brit. med. Ass.).
Zentr.f.Bakt. Ref. 74, 545, 1923.

126. Vedder, A.: Die Hitzeresistenz von getrockneten Bakteriophagen.
Zentr.f.Bakt. Orig.I. 125, 111, 1932.
127. Wahl, R.: Action du sublimé sur le bactériophage
conditions d'inactivation et de réactivation.
C.r. Soc. Biol. 131, 234, 1939.
128. Watanabe, T.: Desinfektionsversuche mit Bakteriophagen.
Arch. f. Hyg. 92, 1, 1924.
129. Watson, J.D.: The Properties of x-ray-inactivated bacterio-
phage. I. Inactivation by "Direct Effect".
J. of Bact. 60, 397, 1950.
130. Weidel, W.: Bakteriophage. Fortschr. d. Botanik.
15, 513, 1954.
131. Weidel, W.: Über die Zellmembran von Escherichia Coli
B.I. Präparierung der Membran. Analytische
Daten. Morphologie. Verhalten der Membranen
gegenüber den Bakteriophagen der T-Serie,
Z.f. Naturforschg. 6b, 251, 1951.
132. Weidel, W.: Zusammenhang struktureller und funktioneller
Probleme bei Bakteriophagen.
Zentr.f.Bakt. Orig.I. 164, 136, 1955.
133. Weidel, W., Koch, G., Lohss, H.: Über die Zellmembran von Escherichia Coli
B.II. Der Receptorkomplex für die Bakterio-
phagen T₃, T₄ und T₇.
Z.f. Naturforschg. 9b, 398, 1954.
134. Weidel, W., Koch, G., Bobosch, K.: Über die Receptorsubstanzen für den Phagen T₅.
I. Extraktion und Reindarstellung aus E. coli
B. Physikalische, chemische und funktionelle
Charakterisierung.
Z.f. Naturforschg. 9b, 573, 1954.
135. Weidel, W., Koch, G.: Über die Receptorsubstanz für den Phagen T₅.
III. Serologische Untersuchungen.
Z.f. Naturforschg. 10b, 694, 1955.

136. Wells, A. Y.,
Sherwood, N. P.: Sélective action of dyes and of other
disinfectants on bacteriophages.
J. inf. Diss. 55, 195, 1934.
137. Wolff, L.,
Janzen, J. W.: Action de divers antiseptiques sur le
bactériophage de d'Hérelle.
C. r. Soc. Biol. 87, 1087, 1922.
138. Wollman, E.,
Lacassagne, H.: Evaluation de la taille relative des bacté-
riophages par leur radiosensibilité.
C. r. Soc. Biol. 131, 959, 1939.
139. Wollman, E.,
Lacassagne, H.: Recherches sur le phénomène de Twort-
d'Hérelle. VI. Evaluation des dimensions
des bactériophages au moyen des rayons X.
Ann. Inst. Pasteur 64, 39, 1940.
140. Zaytzeff-Jern, J.,
Frank-Meleney, L.: Effect on bacteriophage of pronylin,
prontosil, sulfapyridin and other antiseptics
and dyes used in surgical practice.
J. Labor a. clin. Med. 24, 1017, 1936.

VII. Lebenslauf.

Ich, Elisabeth Metzger, wurde am 7. April 1928 als Tochter des Regierungsveterinärrats Dr. Philipp Metzger und dessen Ehefrau Luise, geb. Stöldt, in Heidelberg geboren. Dasselbst verbrachte ich meine früheste Jugend bis zur Versetzung meines Vaters im Dezember 1932 nach Müllheim/Baden.

Nach dem Besuch der Volksschule (1934-37) trat ich in die Oberrealschule in Müllheim ein, an der ich im Sommer 1947 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1950 begann ich mein Studium zunächst an der Medizinischen Fakultät der Albert Ludwigs-Universität in Freiburg und wechselte im Sommersemester 1951 an die Veterinärmedizinische Fakultät der Justus Liebig-Universität in Gießen über. Hier legte ich die tierärztlichen Vorprüfungen und im Wintersemester 1954/55 die tierärztliche Prüfung ab.

Meine Praktikantenzeit legte ich vom 15.2. - 15.5.1955 in der Tierklinik des Tierhygienischen Instituts Freiburg und vom 1. August bis 1. November 1955 in der Rinderklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover ab.

Anschließend befaßte ich mich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit im Tierhygienischen Institut Freiburg; sie wurde am 15.12.1956 abgeschlossen.

Am Schlusse meiner Arbeit sei es mir gestattet, Herrn Professor Dr. T r a u t w e i n für die Überlassung des vorliegenden Themas zu danken. Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. R o o t s dafür danken, daß er mir mehrere S.gallinarum-Stämme zur Verfügung gestellt hat.

Für seine freundliche Unterstützung bei der Vornahme meiner Versuche sage ich Herrn Dr. H a m m e r, wissenschaftlicher Assistent am Tierhygienischen Institut Freiburg, besonderen Dank.

